

Charakterisierung der apikalen Transportwege und beteiligten Proteinkomponenten in polaren Epithelzellen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Catharina Cramm-Behrens

Salzgitter-Bad

Marburg / Lahn 2008

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Februar 2004 bis März 2008 am Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie in Marburg, unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf Jacob angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ralf Jacob

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2008

Irene und Christine Cramm-Behrens
Maria Mensch

Kurzbeschreibung

Die Plasmamembran von polarisierten Epithelzellen besteht aus zwei unterschiedlichen Bereichen, einer apikalen und einer basolateralen Domäne. Aufgrund ihrer spezifischen Funktionen weisen sie eine asymmetrische Verteilung von Lipid- und Proteinkomponenten auf. Dies setzt genaue Sortier- und Transportmechanismen voraus, welche neu synthetisiertes Material zu ihrer korrekten Zielmembran befördern. Polypeptide der apikalen Membran erreichen ihre Zielmembran über den sekretorischen Transportweg vom ER durch den Golgi-Apparat zum TGN, von wo sie in apikale Transportvesikel sortiert werden. Die Einsortierung in verschiedene Vesikelpopulationen erfolgt für apikale Proteine abhängig von ihrer *raft*-Assoziation.

Ziel der Arbeit war die Erforschung der Transport- und Sortiermaschinerie im apikalen Transport. Dafür wurden zwei Modellproteine verwendet, die *raft*-assoziierte SI und die nicht-*raft*-assoziierte LPH.

Biochemische und konfokalmikroskopische Studien konnten zeigen, dass die SI und LPH auf ihrem Weg zur apikalen Membran endosomale Kompartimente durchqueren. Darüber hinaus konnte die Rolle des Lektins Galektin-3 in LPH-tragenden Vesikeln und die Rolle der ALPK-1-Kinase in SI-tragenden Vesikeln charakterisiert werden.

Schlagworte: apikale Sortierung, Endosomen, Epithelzellen, Proteintransport

Abstract

The plasma membrane of polarized epithelial cells is divided into two separate membrane compartments, the apical and the basolateral domain. Based on their functional specialization the domains are composed of different proteins and lipids. This is maintained by an intracellular machinery that directs newly synthesized material into the correct target membrane. Polypeptides from the apical membrane domain of epithelial cells classically reach their destination by a sequential passage from the ER through the Golgi to the TGN, from where they are sorted into apical transport vesicles. Dependent on their lipid raft affinity apical proteins are segregated into distinct vesicle populations.

The investigations are focused on the transport and sorting machinery in apical transport. For this, two model proteins were used, the lipid raft-associated SI and the non-raft-associated LPH.

Biochemical approaches and fluorescence microscopy studies identified that SI and LPH traverse endosomal compartments before entering the apical membrane. Furthermore the role of the lectin galectin-3 in LAV and the role of the kinase ALPK-1 for SAV were reported.

Keywords: apical sorting, endosomes, epithelial cells, protein transport

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	8
1.1	Zum Inhalt	8
1.2	Vorwort	9
2.	Literaturübersicht	10
2.1	Biosynthese und Transport von Proteinen	10
2.2	Intrazellulärer Proteintransport	11
2.3	Polare Epithelzellen	13
2.4	Sortiersignale	14
2.5	Einfluss des Zytoskeletts im polarisierten Transport	17
2.6	Proteinsortierung – TGN und endosomale Kompartimente	18
2.7	Funktion und Vorkommen von Rab-Proteinen	20
2.7.1	Intrazelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen	22
2.7.2	Der GTPase-Zyklus	25
2.8	Zentrale Proteine der vorliegenden Arbeit	27
2.8.1	Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH)	27
2.8.2	Saccharase-Isomaltase (SI)	30
2.8.3	Galektin-3	33
2.8.4	Alpha-Kinase 1	36
2.8.5	Rab4	38
2.8.6	Rab8	39
2.8.7	Rab11A	41
2.8.8	Zielsetzung der Arbeit	42

3.	Ergebnisse	43
3.1	Alpha-Kinase 1, eine neue Komponente im apikalen Proteintransport	43
3.2	Die Notwendigkeit von Galektin-3 für die apikale Proteinsortierung	46
3.3	Endosomen sortieren apikale Proteine in verschiedene Vesikelpopulationen	49
3.4	Unveröffentlichte Daten	52
3.4.1	Konfokalmikroskopische Analysen	52
3.4.2	Intrazelluläre Lokalisation von endogenen Rab-Proteinen in mit SIYFP und LPHmyc transfizierten COS-1-Zellen	54
3.4.3	Quantitative Auswertung der Kolokalisationsstudien	56
3.4.4	Der Einfluss der Rab-Proteine auf den sekretorischen Transport von SI und LPH in COS-1-Zellen	58
3.4.5	Biochemische Transportanalysen von SI und LPH in MDCK-Zellen	60
3.4.6	Quantitative Analyse des TGN-Exit-Experiments, Publikation 3, Fig.5	62
4.	Übergreifende Diskussion	64
5.	Zusammenfassung	76
6.	Summary	78
7.	Literaturverzeichnis	79
8.	Anhang	97
8.1	Publikation 1: α-Kinase 1, a New Component in Apical Protein Transport	98
8.2	Publikation 2: Requirement for Galectin-3 in Apical Protein Sorting	105
8.3	Publikation 3: Endosomes sort Apical Cargo into Distinct Transport Carriers	114
8.4	Methoden	130
8.4.1	Transiente Transfektion von COS-1-Zellen	130
8.4.2	TGN-Block und TGN-Exit – Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	131
8.4.3	Immunfluoreszenz	131
8.4.4	Auswertung der Kolokalisationsstudien anhand eines Zytofluorogramms	132

8.4.5	Biosynthetische Markierung und Oberflächenimmunpräzipitation	133
8.4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	135
8.5	Lebenslauf	137
8.6	Eidesstattliche Erklärung	138
8.7	Erklärung des Eigenanteil	139
	Danksagung	140

Abkürzungsverzeichnis

AEE	<i>apical early endosome</i>
ALPK-1	Alpha-Kinase 1
AP-1B	Adapterprotein-1B
ARE	<i>apical recycling endosome</i>
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäure
ASE	<i>apical sorting endosome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	<i>basolateral sorting endosome</i>
Caco-2	Humane Colon-Carzinom-Zelllinie
CE	<i>common endosome</i>
CCV	<i>clathrin-coated vesicle</i>
cDNS	copy- oder komplementäre DNS
Gi	Curie
COS-1	Affennierenzelllinie (<i>Cercopithecus aethiops</i>), transformiert mit mutiertem SV40
CPK	konventionelle Proteinkinase
CRD	<i>carbohydrate-recognition domain</i>
CRE	<i>common recycling endosome</i>
C-Terminus	Carboxyl-Ende eines Proteins
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRM	<i>detergent resistant membrane</i>
DsredMonomer	Rot fluoreszierendes Protein drFP583 aus <i>Discosoma spec.</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAE	<i>early apical endosome</i>
EBE	<i>early basolateral endosome</i>
ECFP	<i>Enhanced Cyano Fluorescent Protein</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	<i>early endosome</i>
EEA1	<i>early endosomal antigen 1</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	(<i>et alii</i>)- und andere
EYFP	<i>Enhanced Yellow Fluorescent Protein</i>
FKS	Fötales Kälberserum
GA	Golgi-Apparat
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDF	GDI-Dissoziationsfaktor
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor</i>
GEM	<i>Glycolipid and cholesterol enriched membrane</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GT	Galaktosyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin des Influenza-Virus
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
Lamp	<i>lysosome associated membrane protein</i>
LAV	LPH-tragendes apikales Vesikel
LDL-R	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LE	<i>late endosome</i>
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
LPH _c	komplex glykosylierte Form der LPH
LPH _h	mannosereich glykosylierte Form der LPH
LYS	Lysosom
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MAL	<i>myelin and lymphocyte protein</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i> , Hundenierenzelllinie
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MT1-MMP	Matrix-Metalloproteinase
MVB	<i>multi vesicular body</i>
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rab	<i>Ras-related proteins in brain</i>
Ran	<i>Ras homolog in nucleus</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RE	<i>recycling endosome</i>
Rho	<i>Ras homolog</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop
SAV	SI-tragendes apikales Vesikel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>secretory protein</i>
SI	Saccharase-Isomaltase
SI _c	komplex glykosylierte Form der SI
SI _h	mannosereich glykosylierte Form der SI
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
SV40	Simian Virus 40 (Affenvirus)
TFP	Trifluorperazin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TX-100	Triton X-100
ÜN	über Nacht
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis-Virus-Glykoprotein
vWkA	von-Willebrand-Faktor A
WT	Wildtyp
Ypt	<i>yeast protein</i>

1. Einleitung

1.1. Zum Inhalt

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse molekularer Vorgänge im apikalen Proteintransport. Am Beispiel der beiden Modellproteine Saccharase-Isomaltase (SI) und Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) wurden die Sortierung und der Transport in polaren Epithelzellen untersucht. Die drei nachfolgenden Publikationen, welche dieser Arbeit zugrunde liegen, sind im Anhang beigefügt. Die wissenschaftlichen Arbeiten wurden am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Jacob durchgeführt.

Alpha-Kinase 1, a New Component in Apical Transport

J. Biol. Chem., 2005 Jul 8; 280 (27): 25637-43

Requirement for Galectin-3 in Apical Protein Sorting

Curr. Biol., 2006 Feb 21; 16 (4): 408-414

Endosomes sort Apical Cargo into Distinct Transport Carriers

Traffic, submitted

In der Literaturübersicht wird zunächst der sekretorische Transportweg in Epithelzellen beschrieben, sowie dessen Sortiermechanismen und Sortierstationen. Anschließend erfolgt eine Beschreibung der beiden Modellproteine SI und LPH, einschließlich der in dieser Arbeit verwendeten Proteine. Im Ergebnisteil erfolgen die Zusammenfassungen und Erläuterungen der wesentlichen Ergebnisse der Publikationen sowie zusätzlich durchgeführter Versuche. Abschließend wird durch eine übergreifende Diskussion der Inhalt der einzelnen Teilprojekte miteinander zu einem Gesamtbild verknüpft.

1.2 Vorwort

In einem Organismus werden unterschiedliche Funktionen durch verschiedene Organe übernommen. Jedes dieser Organe ist durch spezifische Zelltypen charakterisiert, die je nach Aufgabe unterschiedliche Proteine exprimieren. Je Zelle können bis zu 10.000 verschiedene Proteinarten vorkommen, die eine einwandfreie Funktion der Zelle gewährleisten müssen.

Eine eukaryotische Zelle ist in mehrere funktionell unterscheidbare, membranumschlossene Kompartimente und Organellen unterteilt. Diese Kompartimente und Organellen sind mit jeweils für sie charakteristischen Enzymen und Molekülen ausgestattet.

Der Transport und die Sortierung der Proteine und Lipide in ihre spezifischen Membranbereiche, Kompartimente und Organellen setzt eine komplexe und dynamische Maschinerie voraus.

Die Erforschung der einzelnen Schritte in diesem Prozess ist ein wichtiger Bereich der aktuellen Zellbiologie. Entlang des sekretorischen Transportweges passieren die Proteine Zellkompartimente und Kontrollstellen, die über die Transportrichtung und -kompetenz entscheiden. Dies setzt voraus, dass die transportierten Proteine über charakteristische Merkmale verfügen, anhand derer ihr Bestimmungsort erkannt und der jeweilige Weitertransport initiiert wird.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Erforschung der genauen Sortierungsprozesse und deren intrazellulärer Lokalisation.

2. Literaturübersicht

2.1 Biosynthese und Transport von Proteinen

Die Biosynthese der im Zellkern kodierten Proteine beginnt an den Ribosomen. Diese können in zwei räumlich voneinander getrennte Gruppen eingeteilt werden, die zytoplasmatischen und die ER-gebundenen. Die Synthese von zytoplasmatischen Proteinen sowie solchen, die für Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen oder für den Zellkern bestimmt sind, erfolgt an ungebundenen zytoplasmatischen Ribosomen. Im Gegensatz dazu werden Proteine der Plasmamembran, der Lysosomen, des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparates (GA) sowie die sekretorischen Proteine an membranständigen Ribosomen synthetisiert, welche an der Zytosolseite der ER-Membran gebunden sind (Abb. 2.1).

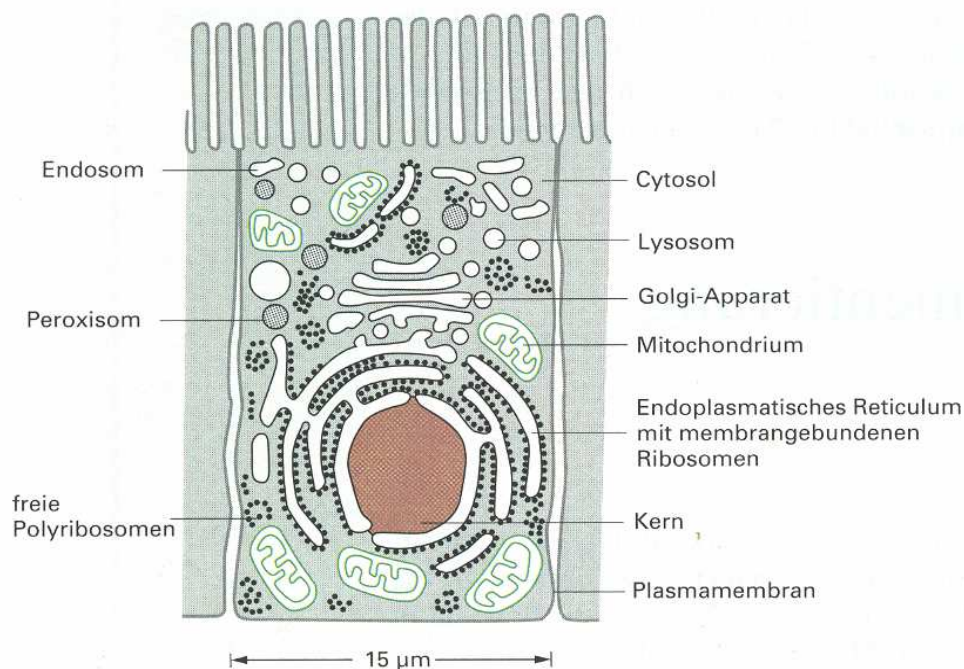


Abb. 2.1: Schematische Darstellung subzellulärer Komponenten einer Säugetierzelle

Zytosol, ER, Golgi-Apparat, Zellkern, Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen und Peroxisomen stellen räumlich getrennte Kompartimente dar, die vom Rest der Zelle durch mindestens eine, selektiv permeable, Membran abgeteilt sind.

(Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, Seite 652)

Die am rauen ER gebildeten Proteine können in den von Palade beschriebenen sekretorischen Transportweg einmünden (Palade, 1975). Sie werden durch die ER-Membran transloziert, im ER-Lumen mit Hilfe von Chaperonen gefaltet und gelangen schließlich in den Golgi-Apparat, von wo sie endgültig zu ihrem Bestimmungsort sortiert werden (Bacon *et al.*, 1989; Matter und Mellman, 1994; High *et al.*, 2000). Im Bereich des *trans*-Golgi-Netzwerkes (TGN) werden sie dazu in verschiedene Vesikel eingebaut und zur Zelloberfläche bzw. zu den Lysosomen transportiert (Letourneur *et al.*, 1995; Toomre *et al.*, 1999; Kaether *et al.*, 2000).

2.2 Intrazellulärer Proteintransport

Das ER und der Golgi-Apparat gehören zu den Membransystemen, die für eine räumlich organisierte Synthese von Proteinen und ihren Transport zu den einzelnen Bestimmungsorten sorgen.

Um zum ER transportiert zu werden, tragen naszierende Polypeptidketten ein spezifisches Signal, welches aus hydrophoben Aminosäuren besteht und meist aminoterminal gelegen ist (Martoglio und Dobberstein, 1998). Damit werden die freien Ribosomen, an denen die Biosynthese begonnen hat, zum ER gelenkt. Die Bindung der Signalsequenz des Peptids an das Signal-Erkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) führt zur Translokation durch oder Integration in die ER-Membran (Bacher *et al.*, 1996). Die Integration erfolgt bei integralen Membranproteinen entweder über einen in der Phospholipid-Doppelschicht eingebetteten Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker; Englund, 1993) oder über eine bzw. mehrere Transmembrandomänen. Nach dem Transfer der wachsenden Peptidkette durch den Translokationskanal erfolgt die Modifikation durch einen Signal-Peptidase- und Oligosaccharyl-Transferase-Komplex (Corsi und Schekman, 1996; Matlack *et al.*, 1998). Es erfolgen die ersten posttranslationellen Modifikationen des neu gebildeten Polypeptids. Es kommt zur Ausbildung intramolekularer und intermolekularer Disulfidbrücken sowie mittels Chaperonen zur korrekten Faltung der Polypeptidkette (Gallagher *et al.*, 1988; Gething und Sambrook, 1992; Letourneur *et al.*, 1995; High *et al.*, 2000). Eine weitere wichtige Veränderung ist die Assemblierung von Polypeptiduntereinheiten

zu multimeren Proteinen. Neben diesen Vorgängen finden im ER noch weitere Prozesse statt, wie spezifische proteolytische Spaltungen oder die Anheftung von Kohlenhydratketten. Bei dem Prozess der Glykosylierung handelt es sich um die am häufigsten vorkommende Art der chemischen Modifizierung eines Proteins (Gilmore, 1993).

Sekretorische und Transmembranproteine können erst nach einem Qualitätskontrollmechanismus das ER verlassen. Korrekt gefaltete Proteine verlassen das ER und werden über Vesikel zum Golgi-Komplex transportiert (Presley *et al.*, 1997), wobei falsch gefaltete Proteine ins Zytoplasma geschleust und dort abgebaut werden (Ellgaard und Helenius, 2001). Mittels vesikulärem Transport gelangen die Proteine vom *cis*-Golgi-Netz durch die verschiedenen Golgi-Zisternen hin zum TGN. Im *medialen* Golgi-Apparat erfolgen die meisten Modifikationen der terminalen Glykosylierungen und proteolytischen Spaltungen (Naim *et al.*, 1991; Naim und Lentze, 1992). Vom TGN aus werden die Proteine dann in Vesikeln zur Zelloberfläche oder den Lysosomen befördert (Griffiths und Simons, 1986). Nach heutigen Erkenntnissen erfolgt der Transport zwischen ER und Golgi-Apparat bis hin zum TGN automatisch für alle Proteine, sofern keine Signale für eine Retention vorliegen. Für solch ein Zurückhalten bestimmter Proteine im ER oder GA werden spezifische „Retentionssignale“ postuliert, wovon einige schon bekannt sind, z.B. die C-terminale KDEL-Sequenz (Rothman und Wieland, 1996). Die Überführung vom TGN zur Plasmamembran beginnt mit der Sortierung der Proteine und der Abschnürung von *post*-Golgi-Vesikeln. Hierauf folgen der Transport entlang des Zytoskeletts mit Hilfe so genannter Motor-Proteine, das Andocken an die Plasmamembran und die Fusion des Vesikels mit der Membran. Dabei handelt es sich um komplexe Prozesse, die Gegenstand der heutigen Forschung sind.

2.3 Polare Epithelzellen

Die Studien der vorliegenden Arbeit wurden u.a. anhand polarer Epithelzellen (Abb. 2.1) durchgeführt. Bei diesen ist ein gerichteter Transport von sekretorischen und Plasmamembranproteinen unerlässlich. Die Plasmamembran der Enterozyten spiegelt die hohe Polarisierung dieser Zellart wieder, da sie über zwei abgegrenzte Membrandomänen verfügt, die sich deutlich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden (Rodriguez-Boulau und Powell, 1992; Caplan, 1997; Massey-Harroche, 2000). Die zum Lumen des jeweiligen Organs gerichtete apikale Domäne besitzt oft spezielle Merkmale, wie z.B. Mikrovilli, während die übrige Plasmamembran als basolateral bezeichnet wird. Strukturen, die die unterschiedliche Zusammensetzung beider Membrandomänen ermöglichen, sind z.B. so genannte *tight junctions*, welche Proteine und Lipide daran hindern, zwischen den Membrandomänen hin und her zu diffundieren (van Meer und Simons, 1986), und das kortikale Zytoskelett, welches selektiv bestimmte Transmembranproteine binden kann (Le Gall *et al.*, 1995).

Die Ausbildung und Erhaltung dieser asymmetrischen Zelloberfläche ist für die physiologischen Funktionen der Zelle – wie Signalübermittlung, Absorption oder Sekretion – von essentieller Bedeutung. Als Beispiel seien hier die Zellen des Darmepithels genannt. Die apikale Domäne ragt ins Darmlumen und reichert dort intestinale Hydrolasen an, welche der Spaltung und Aufnahme von Nahrungsbestandteilen dienen (Bouma *et al.*, 1990). Der basolaterale Plasmamembranbereich hingegen ist für den Austausch der gewonnen Nährstoffe mit den Nachbarzellen und der Blutbahn zuständig (Hauri und Matter, 1991; Rodriguez-Boulau und Powell, 1992; Ikonen und Simons, 1998).

2.4 Sortiersignale

Derzeit erfolgt eine intensive Erforschung der Transport- und Sortiermechanismen zur apikalen und basolateralen Membran; einige konnten bereits identifiziert werden.

Der Prozess der Sortierung setzt voraus, dass die betreffenden Proteine in ihrer Sequenz eine Information tragen und damit direkt oder indirekt eine korrekte Zuordnung gewährleisten (Hunziker *et al.*, 1991; Casanova *et al.*, 1991; Matter *et al.*, 1992).

Signale für den basolateralen Transport sind im zytoplasmatischen Teil in der Nähe der Transmembrandomäne des Proteins lokalisiert (Hunziker *et al.*, 1991; Casanova *et al.*, 1991; Honing und Hunziker, 1995). Hierbei handelt es sich um spezifische Aminosäuresequenzen (LL, IL oder YXX Φ), die von so genannten Adapterproteinen erkannt und gebunden werden (Matter *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1993; Matter und Mellman, 1994; Monlauzeur *et al.*, 1995; Bonifacino und Dell'Angelica, 1999; Simmen *et al.*, 2002). So wird das Tyrosin-Motiv von der γ 1-Untereinheit des AP-1-Komplexes gebunden, wohingegen Di-Leucin-Motive mit der β -Untereinheit von AP-1 interagieren (Rapoport *et al.*, 1998). Der für Epithelzellen spezifische Adapter-Komplex AP-1B spielt etwa beim Transport basolateraler Proteine, wie z.B. des LDL-Rezeptors und des vesikulären Stomatitis-Virus-Glykoproteins (VSV-G), eine essentielle Rolle (Ohno *et al.*, 1995; Folsch *et al.*, 1999; Ang *et al.*, 2003; Gravotta *et al.*, 2007).

In Studien von Wehrle und Haller konnte gezeigt werden, dass sogar ein einzelnes Leucin-Motiv als basolaterales Sortiersignal fungieren kann (Wehrle-Haller und Imhof, 2001).

Im Gegensatz zum basolateralen konnte beim apikalen Transport bisher keine Interaktion zwischen Sortiersignalen und Adapterproteinen oder Rezeptoren nachgewiesen werden (Delacour und Jacob, 2006).

Neben dem zytoplasmatischen Teil der Proteine wurden hier auch Sortiersignale im Transmembran- und extrazellulären Bereich gefunden (Lin *et al.*, 1998; Chuang und Sung, 1998; Jacob *et al.*, 2000a).

Proteine, die über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker an der Lipid-Doppelschicht befestigt sind, werden über diese im ER erfolgende Verankerung sortiert (Lisanti *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1989; Lisanti *et al.*, 1989; Brown und Rose, 1992; Englund, 1993).

N- und O-Glykane fungieren ebenfalls als apikale Sortiersignale im Transport in polaren Epithelzellen (Scheiffele *et al.*, 1995; Fiedler und Simons, 1995; Naim *et al.*, 1999; Alfalah *et al.*, 1999; Benting *et al.*, 1999; Jacob *et al.*, 2000b; Martinez-Maza *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2004). Bei der N-Glykosylierung handelt es sich jedoch um kein universelles apikales Sortiersignal. Anhand des Neurotrophinrezeptors p75, einem N- und O-glykosylierten Protein, konnte gezeigt werden, dass N-Glykane für den apikalen Transport in MDCK-Zellen nicht essentiell sind (Yeaman *et al.*, 1997). Sowohl p75 als auch die Saccharase-Isomaltase sind neben den N-Glykanen stark O-glykosyliert. Eine Deletion der O-Glykane führt zu einer Fehlsortierung dieser Proteine von der apikalen Membran zu beiden Membrandomänen (Yeaman *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 2000a; Castelletti *et al.*, 2006).

Einige apikale Membranproteine assoziieren während ihres Transports im TGN mit Lipidmikrodomänen, welche reich an Sphingolipiden und Cholesterol sind. Bei dieser Assoziation kommt es zu einem *clustering* von verschiedenen Proteinen, wobei die Mikrodomänen als eine Art Plattform beim Transport dienen (Abb. 2.2). Diese Mikrodomänen werden auch als *rafts* oder *GEMs* (*glycolipid- and cholesterol-enriched membranes*) bezeichnet (Simons und Ikonen, 1997). Diese klassischen *rafts* zeichnen sich durch eine Unlöslichkeit in dem nicht-ionischen Detergens Triton X-100 (TX-100) bei 4 °C aus (Brown und London, 2000; Schuck und Simons, 2004). Als Beispiel für *raft*-assoziierte Proteine seien hier das Hämagglutinin des Influenza-Virus (Tall *et al.*, 2003) und GPI-verankerte Proteine genannt (Rodriguez-Boulán *et al.*, 1984; Fiedler *et al.*, 1993; Schroeder *et al.*, 1998). Es handelt sich dabei um apikal sortierte Proteine, wohingegen basolaterale Proteine in der Regel nicht *raft*-assoziiert sind (Skibbens *et al.*, 1989;

Brown und Rose, 1992; Zurzolo *et al.*, 1994; Paladino *et al.*, 2007). Allerdings konnte festgestellt werden, dass es sich bei *rafts* um kein generelles apikales Sortiersignal handelt. Es konnte gezeigt werden, dass einige GPI-verankerte Proteine zusätzlich zur *raft*-Assoziation für den korrekten Transport N-Glykane benötigen (Benting *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass GPI-verankerte Proteine in so genannten *clustern* an die apikale Membran gelangen (Hannan *et al.*, 1993; Paladino *et al.*, 2007). In Studien von Paladino *et al.* wurde gezeigt, dass es durch Mutationen, die die Oligomerisierung von GPI-Ankern verhindern, zu einer Fehlsortierung von apikalen Proteinen zur basolateralen Membran kommt (Paladino *et al.*, 2004).

2.5 Einfluss des Zytoskeletts im polarisierten Transport

Das Zytoskelett besteht aus drei Sorten polymerer Stränge, den Aktinfilamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Es dient der Zelle nicht nur zur Stabilisation, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei Transportvorgängen, der Mitose und der Ausbildung von Zellfortsätzen. Des Weiteren spielen sowohl die Intermediär- als auch die Aktinfilamente bei den Verbindungen zwischen den einzelnen Zellen, den Hemidesmosomen und Desmosomen, eine Rolle.

Der Transport sowohl apikal als auch basolateral sortierter Proteine findet entlang des Zytoskeletts statt (Toomre *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003).

Am Beispiel des Transferrin-Rezeptors konnte belegt werden, dass eine Latrunculin-B-induzierte Depolarisation von Aktinfilamenten zur Fehlsortierung von der basolateralen Membran zur apikalen Zelloberfläche sowohl in MDCK- als auch Caco-2-Zellen führt (Durrbach *et al.*, 2000; Sheff *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde bewiesen, dass Aktin eine Rolle bei der Regulation der Freisetzung von apikalen *recycling endosomes* spielt (Lapierre *et al.*, 2001).

Für den apikalen Transport konnte gezeigt werden, dass Kinesine und Dynamine entscheidend für den Transport von p75 zur apikalen Membran sind (Kreitzer *et al.*, 2000) und sich das Transportverhalten während der Ausbildung der Polarität in MDCK-Zellen verändert (Kreitzer *et al.*, 2003; Jaulin *et al.*, 2007). Für den *raft*-abhängigen und *raft*-unabhängigen Transport apikaler Proteine konnten Jacob *et al.* zeigen, dass Vesikelpopulationen von SI und LPH entlang von Mikrotubuli transportiert werden. Für einen korrekten Transport benötigen SI-tragende Vesikel (*raft*-abhängig) zusätzlich ein intaktes Aktin-Zytoskelett, wohingegen der Transport für LPH-positive Vesikel (*raft*-unabhängig) Aktin-unabhängig verläuft (Jacob *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 2004).

Diese Studien zeigen, dass Mikrotubuli und Aktinfilamente eine wichtige Rolle bei der Sortierung und dem Transport apikaler sowie basolateraler Proteine im TGN, in *recycling endosomes* und an der Plasmamembran spielen.

2.6 Proteinsortierung – TGN und endosomale Kompartimente

In der Vergangenheit galt das TGN als Sortierstelle für neu synthetisierte apikale und basolaterale Proteine (Rodriguez-Boulau und Nelson, 1989; Wandinger-Ness *et al.*, 1990). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass apikale und basolaterale Proteine das TGN in getrennten Vesikeln verlassen (Keller *et al.*, 2001; Hua *et al.*, 2006). Allerdings kann bis heute nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil des Sortiermechanismus erst nach Verlassen des TGN in endosomalen Kompartimenten stattfindet.

Für den direkten apikalen Transport von *raft*-abhängigen und *raft*-unabhängigen Vesikelpopulationen wurde bewiesen, dass die Trennung der Vesikelpopulationen von SI und LPH erst nach Verlassen des TGN erfolgt (Jacob und Naim, 2001).

In jüngsten Studien konnte dargelegt werden, dass so genannte *common recycling endosomes* (CRE) eine Rolle in der Sortierung basolateraler Proteine spielen (Abb. 2.2, Weg 3, 4 + 5). Als Beispiel sei VSV-G genannt, welches wenige Minuten nach Verlassen des TGN Transferrin-positive CRE passiert (Leitinger *et al.*, 1995; Ang *et al.*, 2004). Endosomen spielen bei Sortierprozessen, beim sekretorischen Transportweg und dem *Recycling* von Proteinen zur Membran eine entscheidende Rolle. Die verschiedenen endosomalen Kompartimente können anhand ihres pH-Wertes und bestimmter Markerproteine charakterisiert werden (siehe Abb. 2.2). Als Markerproteine gelten u.a. Rab-Proteine, welche zur Unterscheidung verschiedener endosomaler Kompartimente in der Forschung verwendet werden. In Abschnitt 2.7 wird auf ihre Funktion und Bedeutung im Einzelnen eingegangen.

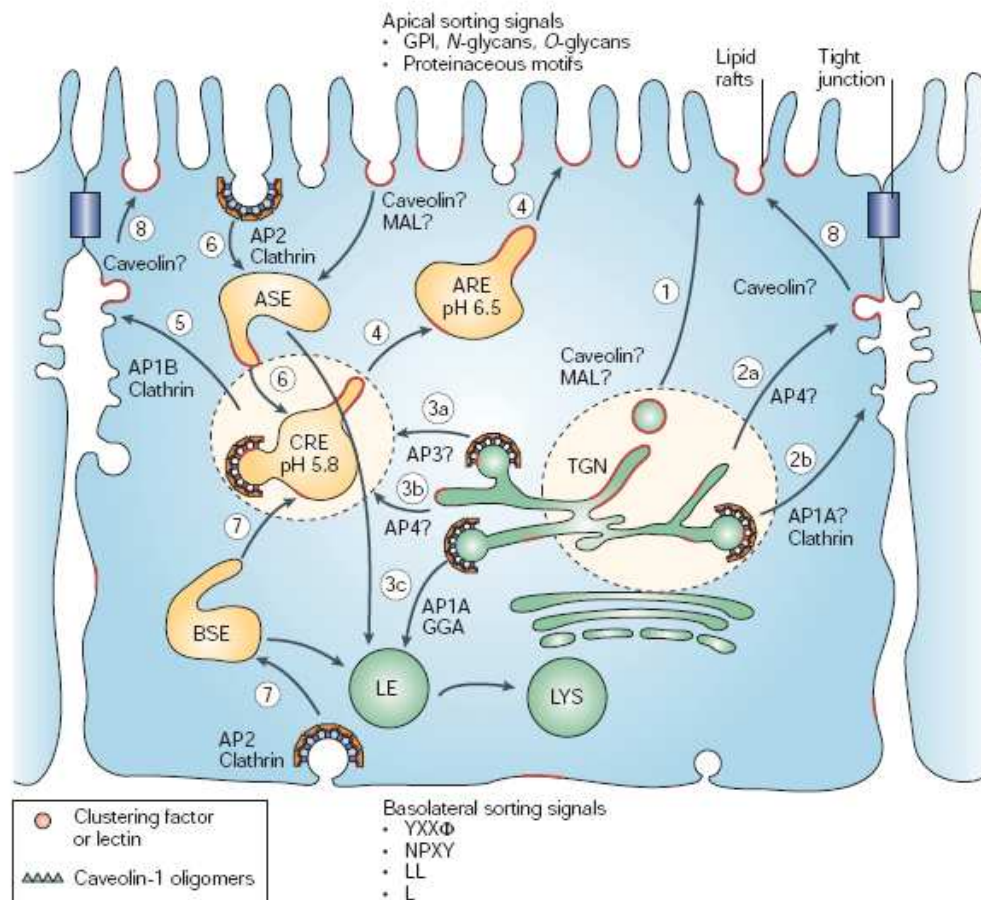


Abb. 2.2: Polare Transport- und Sortiermechanismen

Apikale Wege (1 + 4):

GPI-Anker, N- und O-Glykane sortieren apikale Proteine im TGN sowie in *common recycling endosomes* (CRE) und *apical recycling endosomes* (ARE).

Basolaterale Wege (2 + 5):

Basolaterale Signale interagieren mit Adapterproteinen im TGN oder den CRE. AP-1B spielt eine Rolle beim Transport von CRE zur Membran, siehe Weg 5.

Endozytose (6 + 7):

Apikale (6) und basolaterale (7) Proteine werden in *apical* (ASE) oder *basolateral sorting endosomes* (BSE) aufgenommen und in CRE gesammelt, um dann durch spezifische Sortiersignale in apikale bzw. basolaterale Transportwege zu gelangen (Weg 4 + 5).

LE, late endosome, LYS, Lysosom

(Rodriguez-Boulán et al., 2005)

Neueste Studien weisen darauf hin, dass ein Teil der apikalen-basolateralen Sortierung in CRE direkt nach Verlassen des TGN stattfinden könnte (Rodriguez-Boulán et al., 2005). Bisher konnte dies aber nur für basolateral sortierte Proteine gezeigt werden (Orzech et al., 2000; Ang et al., 2004). CRE spielen darüber

hinaus eine wichtige Rolle im Sortierprozess basolateral und apikal internalisierter Proteine (Wang *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2000). In Hepatozyten erfolgt der Transport apikal sekretierter Proteine an die basolaterale Membran und von dort über Transzytose und ein spezielles endosomales Kompartiment an die apikale Membran. Hier besteht die Hypothese, dass es sich dabei um das ARE-Kompartiment handelt (Wang *et al.*, 2000; Mostov *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2000; Bastaki *et al.*, 2002). Dieser Transportweg wurde auch für den Transport von GPI-verankerten Proteinen in MDCK-Zellen postuliert, was jedoch bereits widerlegt wurde (Polishchuk *et al.*, 2004; Paladino *et al.*, 2006).

2.7 Funktion und Vorkommen von Rab-Proteinen

Bei den Rab-Proteinen handelt es sich um Enzyme, die zur Superfamilie der kleinen, GTP-bindenden Proteine gehören.

Es handelt sich um monomere Guaninnukleotid-bindende Proteine, die ein Molekulargewicht von 20-40 kDa besitzen (Day *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer Struktur erfolgt eine Einteilung in Ras-, Rho-, Rab / Ypt-, Sar1 / Arf- und Ran-Proteine (siehe Abb. 2.3) (Touchot *et al.*, 1987; Salminen und Novick, 1987; Bourne *et al.*, 1990). Bisher konnten ca. 130 kleine GTP-bindende Proteine identifiziert werden, wobei die Rab-Proteine mit ca. 70 Proteinen die größte Untergruppe innerhalb der Ras-Superfamilie darstellen (Novick und Zerial, 1997; Schimmoller *et al.*, 1998; Stenmark und Olkkonen, 2001; Takai *et al.*, 2001; Colicelli, 2004; Gurkan *et al.*, 2005). Weiter konnten bisher die Funktionen von 36 Rab-GTPasen charakterisiert werden (Schwartz *et al.*, 2007).

Kleine GTP-bindende Proteine kommen in allen Eukaryoten vor und sind an einer Vielzahl zellulärer Regulationsprozesse beteiligt. Ihre Bedeutung für den vesikulären Transport wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* bei genetischen Untersuchungen entdeckt. 1980 identifizierte man eine Gruppe von Genen, die für den sekretorischen Weg in Hefe eine wichtige Rolle spielt. Diese Gruppe wurde als SEC-Mutanten bezeichnet. Bei Sec4 und Ypt1p handelt es sich um die ersten identifizierten Guaninnukleotid-bindenden Proteine, welche eine regulatorische

Vesikel, Mikropinozytose und Phagozytose. Sie kontrollieren den antero- und retrograden Transport zwischen Kompartimenten und sind in den verschiedensten Regulationsprozessen zu finden, wie z.B. der Genexpression und Reorganisation des Zytoskeletts (Pfeffer, 1994; Novick und Zerial, 1997; Martinez und Goud, 1998; Mohrmann und van der Sluijs, 1999; Pfeffer und Aivazian, 2004). In Epithelzellen wirken Rab-GTPasen als Regulatoren beim Transport junktionaler Proteine und Integrine und spielen somit bei der Polarisierung der Zellen eine Rolle.

Die Struktur von GTPasen ist sehr charakteristisch. Die meisten Rab-Proteine besitzen ein C-terminales doppeltes Prenylationsmotiv, eine hypervariable Domäne und zwei *Switch*-Regionen. Das Prenylationsmotiv dient der Anlagerung von Geranylgeranyl-Gruppen an Cystein-Resten, die dann die Anlagerung der Proteine an die Membran ermöglichen und dadurch eine Grundvoraussetzung für das richtige *Targeting* und die Funktion vieler Rab-Proteine sind. Bei den *Switch*-Regionen handelt es sich um flexible Domänen, welche ihre Konformation beim GTP / GDP-Austausch verändern (Overmeyer *et al.*, 1998).

Die hypervariable C-terminale Region weist bei den Rab-Proteinen eine große Diversität auf, wobei bisher zwei Funktionen bekannt sind. Dieser Bereich scheint eine Rolle in der Lokalisation und bei der Interaktion mit anderen Proteinen einzunehmen (Chavrier *et al.*, 1991; Beranger *et al.*, 1994; Olkkonen und Stenmark, 1997; Stenmark und Olkkonen, 2001). Des Weiteren scheint der Bereich für die Interaktion mit Effektorproteinen verantwortlich zu sein (Novick und Brennwald, 1993; Stenmark *et al.*, 1994b; Moore *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 1997).

2.7.1 Intrazelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen

Rab-Proteine besitzen eine charakteristische subzelluläre Lokalisation und sind in allen Kompartimenten des Endomembransystems (ER, Golgi, Endosomen, Lysosomen), dem Zellkern, der Plasmamembran (inklusive *cell junctions* und *focal adhesions*), Mitochondrien und Centriolen lokalisiert. Abbildung 2.4 zeigt eine Übersicht der einzelnen Rab-Proteine und ihre intrazelluläre Lokalisation.

Interessant dabei ist, dass Rab-Proteine auch in gleichen Organellen, jedoch unterschiedlichen Membrandomänen vorkommen können. So finden sich bspw. Rab5 und Rab7 in unterschiedlichen Domänen der *early endosomes* (Vitale *et al.*, 1998; Barbero *et al.*, 2002; Vonderheit und Helenius, 2005).

Rab-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei Andock- und Fusionsprozessen von Membranvesikeln und der Regulation der Entstehung selbiger (Pfeffer, 1999; Pereira-Leal und Seabra, 2000; Segev, 2001; Zerial und McBride, 2001). Dabei spielt die Interaktion von Rab-Proteinen mit spezifischen Effektoren für die temporale und lokale Koordination dieser Zellprozesse eine wichtige Rolle (Gonzalez, Jr. und Scheller, 1999; Christoforidis *et al.*, 1999).

Im Folgenden soll die Lokalisation einiger Rab-Proteine vorgestellt werden. Die Charakterisierung der für diese Arbeit relevanten Rab-Proteine erfolgt in Abschnitt 2.8.

Rab1, -2, -6, -11, -10, -12 und -30 spielen in der Exozytose eine wichtige Rolle (Schwartz *et al.*, 2007). Rab1 und Rab2 sind in den ersten Schritten der Exozytose involviert und sind am antero- und retrograden Transport vom ER zum Golgi beteiligt (Tisdale *et al.*, 1992). Rab6 ist im *medialen* und *cis*-Golgi sowie im TGN zu finden und reguliert dort den *intra*-Golgi-Transport sowie den retrograden Transport vom GA zum ER (Goud *et al.*, 1990; Mayer *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1997). Weitere Golgi-assoziierte Proteine sind Rab12 und Rab30, deren Funktion bisher noch unbekannt ist (de Leeuw *et al.*, 1998).

Rab5 reguliert endozytotische Prozesse und ist sowohl in apikalen als auch basolateralen *early endosomes* (siehe Abb. 2.4) lokalisiert (Bucci *et al.*, 1995; Trischler *et al.*, 1999). Rab8 spielt eine Rolle im Transport von basolateral sortierten Proteinen und befindet sich im CE und im Bereich des TGN (Ang *et al.*, 2003; Henry und Sheff, 2008). Rab10 hingegen wurde in jüngsten Studien als charakteristisches Protein für *common endosomes* beschrieben und spielt eine Rolle beim Transport von den *basolateral sorting endosomes* zu den *common endosomes* (Babbey *et al.*, 2006). Rab7 und Rab9 sind beide in *late endosomes* zu finden und sind in den späten Schritten der Endozytose involviert (Soldati *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1995; Soldati *et al.*, 1995; Diaz *et al.*, 1997; Mohrmann und van der Sluijs, 1999).

In dieser Abbildung ist die Lokalisation einzelner Rab-Proteine dargestellt. Die Pfeile verdeutlichen die Transportprozesse, in denen einzelne Rab-Proteine involviert sind. Farbige Linien charakterisieren die spezifische Lokalisation von Rab-Proteinen in gleichen Organellen, jedoch unterschiedlichen Membrandomänen.
CCV, *clathrin-coated vesicle*

24

2.7.2 Der GTPase-Zyklus

Die GTPasen spielen, wie bereits beschrieben, eine wichtige Rolle in der Regulation des Vesikeltransports, allerdings ist der genaue Mechanismus noch nicht geklärt.

Rab-Proteine fungieren als eine Art molekularer Schalter innerhalb der zellulären Signaltransduktion (Takai *et al.*, 2001), was bedeutet, dass sie in zwei Konformationen vorkommen können. Durch hydrolytische Spaltung von Guanosintriphosphat (GTP) in Guanosindiphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat wechseln sie von einem aktiven in einen inaktiven Zustand (Stenmark und Olkkonen, 2001; Zerial und McBride, 2001; Stein *et al.*, 2003; Bucci und Chiariello, 2006). Interessant hierbei ist der damit verbundene Ortswechsel vom Zytoplasma zur Membran (Fischer *et al.*, 1994). Im aktiven Zustand erfolgt eine Konformationsänderung der Effektor-bindenden Region. Dadurch wird die Interaktion mit Rab-spezifischen Effektorproteinen ermöglicht und der vom jeweiligen Rab-Protein regulierte Prozess initiiert (Novick und Brennwald, 1993; Stenmark *et al.*, 1994a; Moore *et al.*, 1995; Zerial und McBride, 2001; Bucci und Chiariello, 2006). Bei der Gruppe der Effektorproteine handelt es sich um Proteine, die z.B. eine Rolle beim *membrane tethering* oder *docking* spielen oder um Enzyme oder Proteine des Zytoskeletts.

Dieser zyklische Ablauf von Aktivierung, Translokation und Inaktivierung wird im Wesentlichen von drei regulatorischen Proteinklassen gesteuert (siehe Abb. 2.5): Guaninnukleotid-Austausch-Faktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEF), Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDI) und GTPase-aktivierte Proteine (*GTPase activated proteins*, GAP; Takai *et al.*, 1996; Novick und Zerial, 1997; Martinez und Goud, 1998).

Im aktiven Zustand koordinieren Rab-Proteine drei Hauptschritte im Transport. Dabei handelt es sich um die Vesikelbildung (*budding*), die Vesikelbewegung entlang des Zytoskeletts sowie das *vesicle tethering* und die Vesikelfusion mit der Zielmembran (Stein *et al.*, 2003; Grosshans *et al.*, 2006).

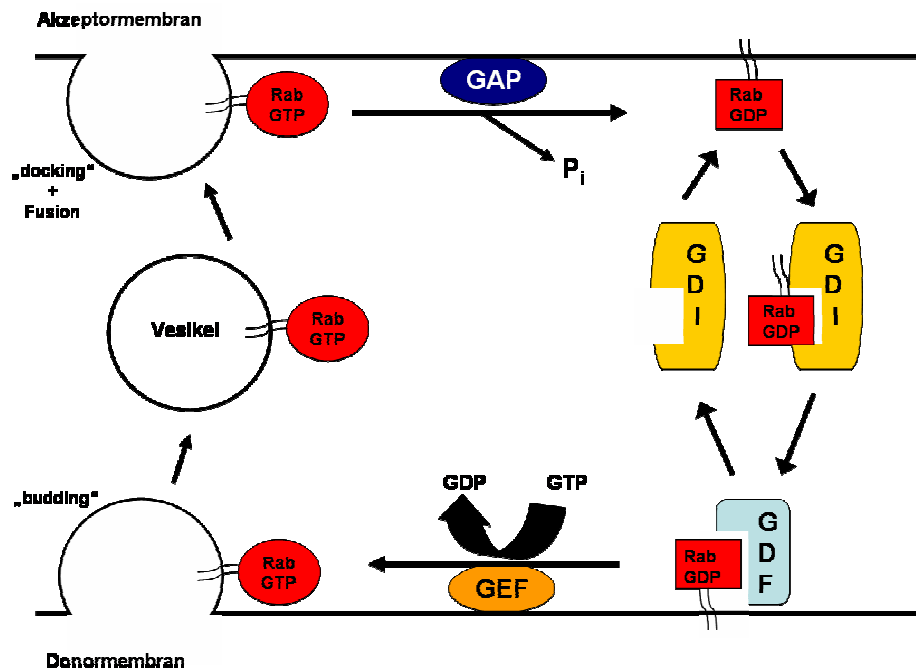


Abb. 2.5: Modell des Rab-Zyklus

Dargestellt wird hier ein stark vereinfachtes Schema des Rab-Zyklus.

Das aktive GTP-gebundene Rab-Protein ist über eine Isoprenylierung in der Donormembran integriert und wird mit dem Vesikel abgeschnürt (*budding*). An der Akzeptormembran findet die Fusion von Vesikel und Membran statt. Anschließend erhöht ein GAP (Walworth *et al.*, 1992) die intrinsische Aktivität der GTPase, so dass GTP zu GDP hydrolysiert wird.

Das GDP-gebundene inaktive Rab-Protein wird von einem GDI-Protein von der Membran gelöst (Chen *et al.*, 1998). Das GDI stabilisiert das Rab-Protein im Zytosol und bringt es erneut zur Donormembran. Es wird vermutet, dass ein GDF (*GDI displacement factor*) das Rab-Protein vom GDI löst und zur Ziellmembran bringt. Dort bewirkt ein GEF den Austausch des GDP durch GTP. GDI kehrt ins Zytosol zurück, um erneut Rab-Moleküle zu binden (Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997). Das Rab-Protein wird erneut aktiviert und der Zyklus beginnt von vorne.

2.8 Zentrale Proteine der vorliegenden Arbeit

2.8.1 Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH)

Zur Aufklärung molekularer Mechanismen des intrazellulären Proteintransportes werden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Modellproteine verwendet. Hierzu zählt die Laktase-Phlorizin-Hydrolase, ein Glykoprotein der apikalen Bürstensaummembran von Dünndarmepithelzellen. Die LPH bildet zusammen mit der Saccharase-Isomaltase, der Maltase-Glykoamylase und der Trehalase die Gruppe der intestinalen Disaccharidasen (Hauri *et al.*, 1985).

Es handelt sich bei der LPH um ein integrales Membranprotein, welches in der apikalen Bürstensaummembran von Dünndarmenterozyten lokalisiert ist. Das unter den Säugetieren ubiquitär vorkommende Enzym besitzt zwei verschiedene hydrolytische Aktivitäten. Zum einen spaltet die Laktase das Disaccharid Laktose, das Hauptkohlenhydrat der Säugermilch, in die resorbierbaren Monosaccharide Glukose und Galaktose (Schlegel-Haueter *et al.*, 1972; Colombo *et al.*, 1973), während die Phlorizin-Hydrolase für die Hydrolyse von Phlorizin und von β -Glykosylceramiden verantwortlich ist (Colombo *et al.*, 1973; Leese und Semenza, 1973; Skovbjerg *et al.*, 1981).

Strukturelle Eigenschaften der humanen LPH

Das Gen der humanen LPH ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert (Kruse *et al.*, 1988) und setzt sich aus 17 Exons zusammen (Boll *et al.*, 1991). Die LPH-cDNS umfasst 6274 Nukleotide und kodiert die 1927 Aminosäuren umfassende Pre-Pro-LPH (Mantei *et al.*, 1988), welche sich aus unterschiedlichen Proteindomänen zusammensetzt. Das Translationsprodukt beginnt am N-terminalen Ende mit einem Signalpeptid, bestehend aus 19 Aminosäuren (Met₁-Gly₁₉), welches für die Translokation der wachsenden Peptidkette ins ER-Lumen verantwortlich ist und hier abgespalten wird (von Heijne, 1986). Daran anschließend befindet sich die Ektodomäne des Proteins (Ser₂₀-Thr₁₈₈₂), die aus der LPH-Prodomäne (LPH α , Ser₂₀-Arg₈₆₈) und einer sich über 1016 AS erstreckenden Domäne der reifen

Bürstensaummembranform, genannt $\text{LPH}\beta_{\text{initial}}$, besteht (Wuthrich *et al.*, 1996; Jacob *et al.*, 1996). Darauf folgt die hydrophobe Membranankersequenz aus 19 AS (MA; Ala-Leu), die das Protein in der Lipiddoppelschicht befestigt (Mantei *et al.*, 1988). Die C-terminale Domäne wird durch den hydrophilen zytoplasmatischen Bereich aus 26 AS gebildet. Aufgrund des extrazellulär gelegenen N-Terminus und des intrazellulär lokalisierten C-Terminus zählt die LPH zu den Typ-I-Membranproteinen (Blobel, 1980), während andere Disaccharidasen, wie die Saccharase-Isomaltase (Semenza, 1979; Hunziker *et al.*, 1986), aufgrund der entgegengesetzten Orientierung als Typ-II-Membranproteine bezeichnet werden.

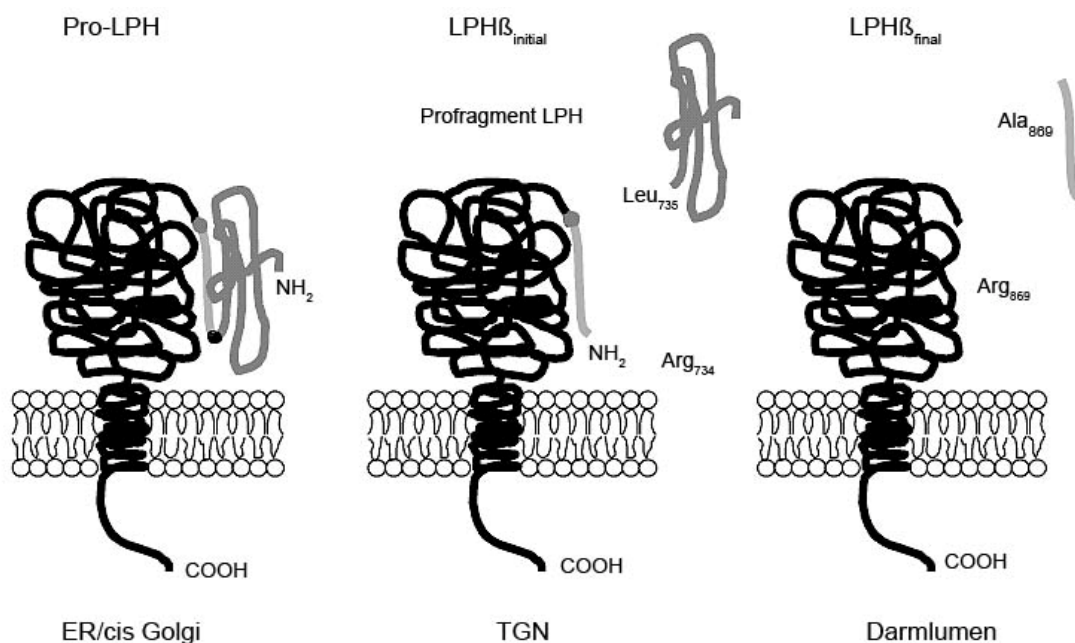


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der LPH-Biosynthese

Im ER erfolgt nach der Abspaltung der Signalsequenz die mannosereiche N-Glykosylierung der pro-LPH. Nach Transport ins *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) erfolgt durch komplexe Glykosylierung und Abspaltung des Profragmentes $\text{LPH}\alpha$ zwischen Arg₇₃₄ und Leu₇₃₅ die Prozessierung des Proteins zu $\text{LPH}\beta_{\text{initial}}$. An der Oberfläche der Enterozyten entsteht schließlich das reife Enzym $\text{LPH}\beta_{\text{final}}$ aufgrund der Spaltung des Proteins zwischen Arg₈₆₈ und Ala₈₆₉ durch das im Darmlumen vorhandene pankreatische Trypsin.

(Grafik R.Jacob)

Die LPH wird als 215 kDa große Pro-LPH in das ER transloziert und dort co-translational N-glykosyliert (siehe Abb. 2.6). Im ER muss sich ein Dimer aus zwei Pro-LPH-Ketten bilden, bevor es in den Golgi-Apparat weitergeleitet werden kann. Der Transport aus dem ER wird bei einem Ausbleiben der Dimerbildung unterbunden (Naim und Naim, 1996). Für diese Dimerisierung ist die Transmembrandomäne der LPH essentiell, wie durch fehlende Assemblierung entsprechender Deletionsmutanten gezeigt werden konnte (Panzer *et al.*, 1998). Die bereits im ER N-glykosidisch angefügten Zuckerketten werden im Golgi-Apparat weiter modifiziert, so dass die LPH im TGN komplex glykosyliert vorliegt. Im Golgi-Apparat erfolgen zusätzliche O-Glykosylierungen an mehreren Stellen des Moleküls, wodurch die Enzymaktivität um das Vierfache erhöht wird (Naim, 1992). Während seiner Entwicklung zum reifen Enzym wird das Pro-LPH-Fragment zweimal gespalten (Wuthrich *et al.*, 1996; Jacob *et al.*, 1997). Bei der ersten Spaltung wird das große α -LPH-Profragment entfernt und die so entstandene Form der LPH wird zur apikalen Membran transportiert. Dort wird sie erneut geschnitten, so dass nun die fertige 160 kDa große β -Form der LPH vorliegt (Naim *et al.*, 1987).

2.8.2 Saccharase-Isomaltase (SI)

Bei der Saccharase-Isomaltase handelt es sich um das zweite Modellprotein, welches für die nachfolgenden Studien verwendet wurde. Wie auch bei der LPH handelt es sich bei der Saccharase-Isomaltase um eine membranständige Disaccharidase der Bürstensaummembran des Duodenums (Semenza *et al.*, 1983). Die beiden Untereinheiten Saccharase und Isomaltase spalten die α -glykosidisch verknüpften Kohlenhydrate Saccharose und Maltose bzw. Isomaltose in ihre Einzelkomponenten auf.

Die beiden homologen Domänen Saccharase und Isomaltase entstehen aus einer Polypeptidkette, dem Vorläuferprotein pro-SI, welches erst im Darmlumen durch Trypsin gespalten wird (Hauri *et al.*, 1985). Beide Untereinheiten der SI bleiben an der apikalen Bürstensaummembran über ionische Wechselwirkungen miteinander verbunden (Naim *et al.*, 1988).

Biosynthese, Reifung und Struktur der humanen Saccharase-Isomaltase

Das Gen, welches für die Saccharase-Isomaltase kodiert, ist auf dem Chromosom 3 lokalisiert. Die SI-cDNS besteht aus 5484 Nukleotiden, welche für 1827 AS kodieren (Green *et al.*, 1987). Die SI ist ein Membranprotein vom Typ II, das heißt, der zytoplasmatische Teil und die Transmembranregion, die Teil der nicht abspaltbaren Signalsequenz sind, befinden sich am N-Terminus (Hunziker *et al.*, 1986).

An den Membrananker schließen sich eine Serin- / Threonin-reiche Stab-Domäne und eine P-Domäne an (Tomasetto *et al.*, 1990), auf welche dann die beiden enzymatisch aktiven Untereinheiten Isomaltase und Saccharase folgen (Hunziker *et al.*, 1986). Diese Stab-Domäne ist stark glykosyliert und wird zur Isomaltase-Untereinheit gerechnet (Hauri *et al.*, 1985).

Das mannosereiche Vorläuferprotein der SI (210 kDa) wird vom ER zum Golgi-Apparat transportiert ohne vorher Dimere zu bilden, wie es bei vielen Proteinen üblich ist. Im Golgi-Apparat erfolgt dann die Prozessierung des mannosereichen, N-glykosylierten Vorläuferproteins (pro-SI_h) zum komplex glykosylierten Molekül.

Im *cis*-Golgi erfolgt die O-Glykosylierung, die für die Sortierung der SI eine entscheidende Rolle spielt.

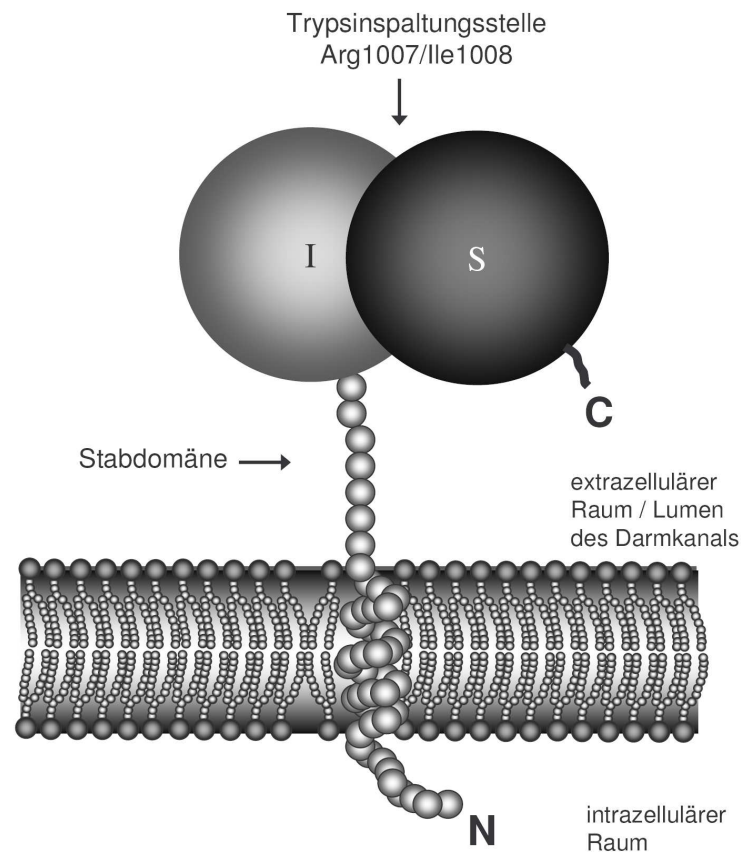


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der SI

Der Aminoterminal (N) befindet sich im zytoplasmatischen Teil des Proteins, das carboxyterminale Ende des Peptids (C) ist zum Lumen des Darmkanals gerichtet (Typ-II-Membranprotein). Zwischen der Isomaltase- und der Saccharase-Untereinheit befindet sich eine Spaltungsstelle für Trypsin, wodurch das Molekül im Darmlumen zur reifen Form überführt wird; die Untereinheiten bleiben hierbei durch ionische Wechselwirkungen miteinander verbunden.

(Grafik: R.Jacob)

Den apikalen, vesikulären Transport der SI vermitteln O-Glykane in der Stab-Domäne, die zu einer Assoziation mit Membranmikrodomänen führen (Alfalah *et al.*, 1999; Jacob *et al.*, 2000b). Beide Modellproteine, LPH und SI, werden mit hoher Effizienz zur apikalen Bürstensaummembran transportiert, wobei die SI über

ihre Assoziation mit Membranmikrodomänen (*rafts*) dorthin gelangt, während die LPH unabhängig von *rafts* apikal sortiert wird. Studien belegen, dass unterschiedliche Zytoskelettkomponenten an diesen apikalen Transportprozessen beteiligt sind (Jacob *et al.*, 2003). So konnte gezeigt werden, dass SI-tragende Vesikel an Mikrotubuli und Aktin-Mikrofilamenten zur apikalen Membran gelangen, wohingegen LPH-tragende Vesikel nur entlang von Mikrotubuli zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass das Motorprotein Myosin 1a in SI-tragenden Vesikeln vorhanden ist, jedoch nicht in LPH-tragenden Vesikeln. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass Myosin 1a eine direkte Rolle beim Aktin-abhängigen Transportweg von SI spielen könnte (Jacob *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 2004).

2.8.3 Galektin-3

Bei der Familie der Galektine handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die spezifisch β -Galaktose- und N-Acetyl-Lactosamin (LacNAc)-Reste in Oligosacchariden binden (Barondes *et al.*, 1994). Die Familie der Galektine umfasst 13 verschiedene Galektine sowie fünf Galektin-ähnliche Proteine, welche aufgrund ihrer Struktur in drei Hauptgruppen – die chimären, die Prototyp- und die *tandem-repeat*-Galektine – eingeteilt werden (Hirabayashi und Kasai, 1993). Ein wichtiges Kriterium bei der Einteilung spielt die so genannte *carbohydrate-recognition domain* (CRD). Sie besteht aus zwölf β -Strängen, welche in zwei β -Faltblättern zu einer β -Sandwichkonfiguration angeordnet sind. Die CRD der einzelnen Galektine unterscheiden sich in den Feinspezifitäten der Zuckerbindung, worauf vermutlich auch die unterschiedlichen biologischen Funktionen der Mitglieder dieser Familie zurückzuführen sind (Hughes, 1999; Hughes, 2001). In Abbildung 2.8 wird eine schematische Darstellung der Galektine gezeigt. Galektin-1, -2 und -5, die zu den Prototyp-Galektinen gehören, besitzen eine CRD und eine kurze N-terminale Domäne.

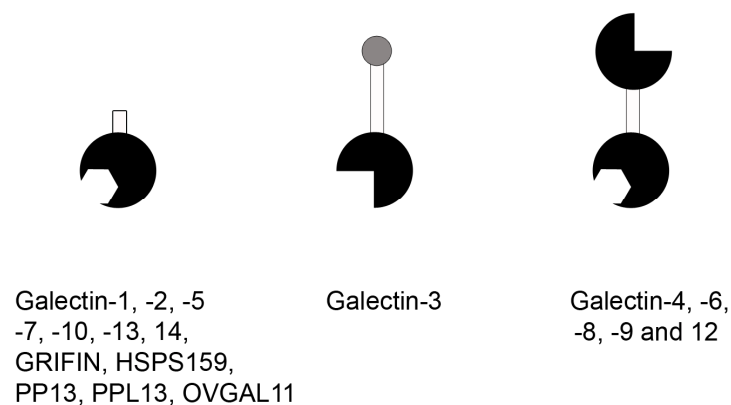


Abb. 2.8: Einteilung und schematische Darstellung der Galektine

Die CRD der Galektine ist als ausgefüllte Struktur dargestellt. Links sind die Prototyp-, in der Mitte die chimären Galektine und rechts die *tandem-repeat*-Galektine dargestellt.

(Leffler *et al.*, 2004)

Galektin-3 hingegen besitzt als chimäres Galektin einen langen N-terminalen Schwanz und ebenfalls eine CRD-Domäne. Die *tandem-repeat*-Galektine bestehen aus zwei unterschiedlichen CRD-Domänen, die durch einen *linker* miteinander verbunden sind (Hughes, 2001; Leffler *et al.*, 2004).

Galektine sind im Organismus an der Regulation von Entzündungsreaktionen, Apoptose, Zellwachstum und Zelladhäsion beteiligt (Leffler *et al.*, 2004; Hughes, 2004; Sato und Nieminen, 2004; Grassadonia *et al.*, 2004; Van Den *et al.*, 2004; Almkvist und Karlsson, 2004; Hirashima *et al.*, 2004).

Struktur

Galektin-3 stellt eine eigene Untergruppe bei den Galektinen dar. Es unterscheidet sich von den anderen Galektinen durch einen langen N-terminalen Schwanz, der aus 8-13 Wiederholungen einer Prolin-, Tyrosin- und Glycin-reichen Sequenz besteht (Leffler *et al.*, 2004). Galektin-3 ist ein Monomer, welches hochmolekulare Komplexe ausbildet, die eine wichtige Voraussetzung für die Funktion von Galektin-3 in der Proteinsortierung darstellen (Patnaik *et al.*, 2006; Delacour *et al.*, 2007). Die Bindung von Galektin-3 an seinen Liganden Galaktose erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen je einem Histidin-, Asparagin- und Argininrest und dem O4-Atom der Galaktose sowie über einen weiteren Argininrest am O3. Neben der Galaktose kann Galektin noch an weitere Liganden, wie z.B. Laktose, binden.

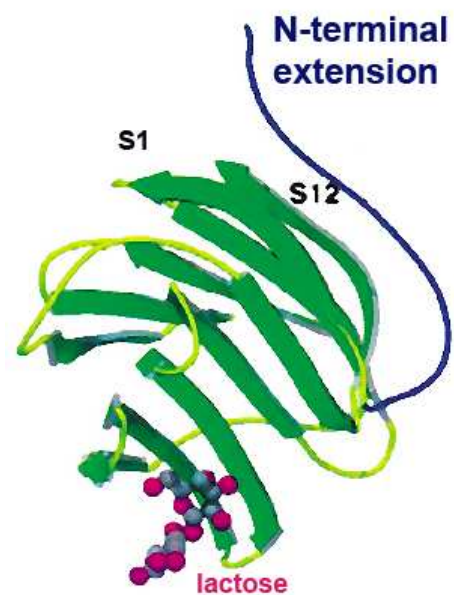


Abb. 2.9: Struktur von Galektin-3

Der N-terminale Schwanz ist in blau dargestellt. Grün gezeichnet sind die β -Stränge S1 und S12 der CRD. Zusätzlich ist Laktose als Ligand gebunden.

(Hughes, 2001)

Es handelt sich bei Galektin-3 um ein Protein, das keine N-terminale Signalsequenz für die Translokation in das Lumen des ER besitzt. Galektin-3 kommt neben seiner zytoplasmatischen Lokalisation auch extrazellulär vor. Der genaue, unkonventionelle Sekretionsweg der Galektine konnte bisher noch nicht entschlüsselt werden. Unkonventionelle Sekretionswege sind für einige Proteine bekannt und es bestehen dazu unterschiedliche Theorien. Zum einen könnte der Transport über vesikuläre Strukturen erfolgen. Dabei werden sekretorische Proteine in Vesikel aufgenommen, die in das Innere endosomaler Strukturen knospen, welches zur Ausbildung von MVB (*multi vesicular bodies*) führt. Durch Fusion der MVB mit der Plasmamembran werden die vesikulären Strukturen, und somit die darin enthaltenen Proteine, in die Umgebung freigesetzt (Hughes, 1999; Stoorvogel *et al.*, 2002; Nickel, 2005). Eine andere Möglichkeit wären spezielle endozytotische Strukturen wie Melanosomen in Melanozyten oder Lysosomen in zytotoxischen T-Zellen, welche durch Fusion mit der Plasmamembran dafür sorgen könnten, dass ihr Inhalt in die Umgebung der Zelle sezerniert wird. ABC-Transporter könnten hierbei die Aufnahme in sekretorische Lysosomen vermitteln (Stinchcombe *et al.*, 2004).

Zwei weitere Theorien der unkonventionellen Sekretion beziehen sich auf eine direkte Translokation der Proteine über die Membran. Dies geschieht zum einen mit Hilfe eines Transporterproteins (z.B. ABC-Transporter) in der Membran oder zum anderen durch einen Prozess, der als *membrane blebbing* bezeichnet wird (Cleves und Kelly, 1996; Freyssinet, 2003; Hugel *et al.*, 2005). Dabei lösen sich Mikrovesikel aus der Plasmamembran ab und werden in den Extrazellularraum freigesetzt.

2.8.4 Alpha-Kinase 1

Alpha-Kinase 1 (ALPK-1) zählt neben der *Dictyostelium myosin heavy chain kinase A* und der *elongation factor 2 kinase* zu der Familie der Alpha-Kinasen, welche erst vor wenigen Jahren identifiziert wurde (Futey *et al.*, 1995; Ryazanov *et al.*, 1997; Cote *et al.*, 1997; Ryazanov *et al.*, 1999; Drennan und Ryazanov, 2004).

ALPK-1 besteht aus 1244 Aminosäuren und weist eine Größe von 137 kDa auf. Exprimiert wird sie in Geweben des Dünndarms, des Magens und der Niere sowie den Lymphknoten (Ryazanova *et al.*, 2001).

Alpha-Kinasen kommen im Genom von Wirbeltieren, Pilzen und Protozoen vor, konnten allerdings nicht in jenem von Insekten, Hefen und höheren Pflanzen identifiziert werden (Drennan und Ryazanov, 2004).

Der Hauptteil der eukaryotischen Proteinkinasen gehört zu der Gruppe der konventionellen Proteinkinasen (CPK), welche aus den Familien der Serin- / Threonin-Kinasen und der Tyrosin-Kinasen besteht (Taylor *et al.*, 1992; Hanks und Hunter, 1995; Johnson und Lewis, 2001; Manning *et al.*, 2002a; Manning *et al.*, 2002b).

Alpha-Kinasen weisen in ihrer Aminosäuresequenz keine Gemeinsamkeiten mit konventionellen Proteinkinasen auf, ähneln diesen aber sehr in ihrer räumlichen Struktur und der Position funktionell bedeutsamer Aminosäuren. Beide Familien der Kinasen bilden eine zweilappige Struktur aus. Der N-terminale Bereich sorgt für die Verankerung und Orientierung des Nukleotids, während der C-terminale Bereich für die Substratbindung und die Einleitung der Phosphorübertragung verantwortlich ist.

Alpha-Kinasen besitzen die Eigenschaft, Aminosäuren zu phosphorylieren, welche sich in α -Helices befinden, wodurch sie auch ihren Namen erhielten (Ryazanov *et al.*, 1999). Hierbei handelt es sich um einen weiteren Unterschied zu den konventionellen Proteinkinasen. Diese phosphorylieren nämlich Aminosäuren, die sich in Schleifen, irregulären Strukturen oder Windungen befinden (Pinna und Ruzzene, 1996).

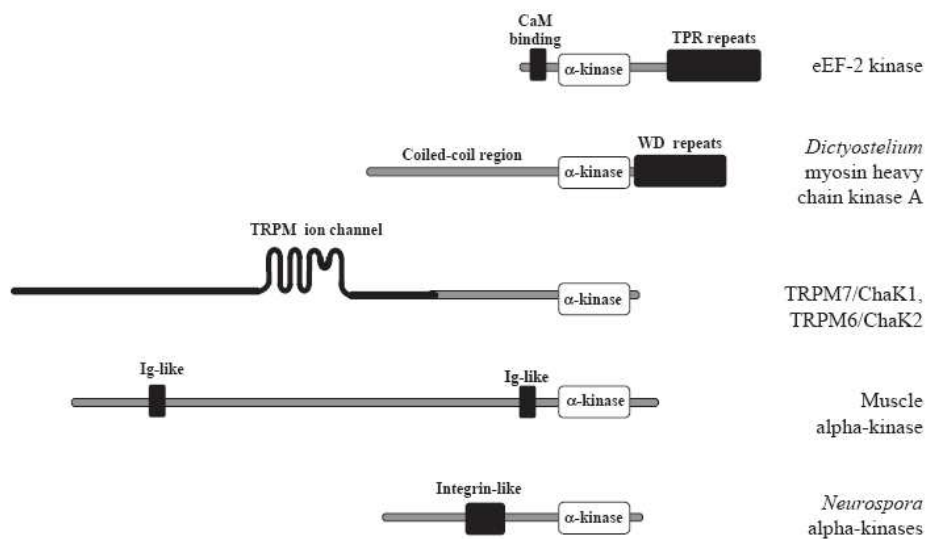


Abb. 2.10: Darstellung der unterschiedlichen Domänen der Alpha-Kinasen

Alpha-Kinase-Domänen können am C- bzw. N-terminalen Ende oder in der Mitte des Proteins lokalisiert sein.

(Drennan und Ryazanov, 2004)

Die Familie der Alpha-Kinasen kann in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine, zu der die ALPK-1 zählt, trägt ihre Kinasedomäne direkt oder nahe am C-Terminus, wohingegen sie sich bei der anderen Gruppe am N-Terminus befindet. Zu der letzten Gruppe zählen die *elongation factor 2*-Kinasen und der Großteil der *myosin heavy chain*-Kinasen A.

Alpha-Kinasen weisen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Domänen auf. Diese umfassen Ionenkanäle, Integrin-ähnliche Domänen, WD- oder TPR-Wiederholungen, Immunoglobulin-ähnliche Domänen oder Calmodulin-Domänen (siehe Abb. 2.10).

2.8.5 Rab4

Rab4 wurde erstmals 1987 im Rattengehirn gefunden (Touchot *et al.*, 1987). Nach der Entdeckung eines zweiten humanen Proteins, das eine 82 %-ige Sequenzhomologie zu Rab4 aufwies, wurde das zuerst entdeckte als Rab4A und das zweite als Rab4B bezeichnet (Chavrier *et al.*, 1990; Huang und Chuang, 1998). Die beiden Rab-Proteine bilden eine eigene Unterfamilie in der Familie der Rab-Proteine. Beide Proteine haben eine Länge von 213 Aminosäuren, wobei Rab4A ein Molekulargewicht von 23871 Da und Rab4B von 23587 Da aufweist.

Rab4 ist neben Rab5 auf frühen Endosomen zu finden, kontrolliert jedoch einen entgegengesetzten Transportweg (van der Sluijs *et al.*, 1991; de Wit *et al.*, 2001). Rab5 reguliert sowohl den Vesikeltransport von der Plasmamembran zu frühen Endosomen als auch deren homotypische Fusion. Rab4 hingegen ist an der Regulation des *Recyclings* von frühen Endosomen zum *recycling compartment* oder direkt zur Plasmamembran (*fast recycling*, Abb. 2.4) beteiligt, wie am Beispiel des Transferrin-Rezeptors gezeigt werden konnte (van der Sluijs *et al.*, 1991; Bucci *et al.*, 1992; van der Sluijs *et al.*, 1992; de Wit *et al.*, 2001). Die Überexpression von Rab4 in MDCK-Zellen führt zu einer Umverteilung des Transferrin-Rezeptors von den frühen Endosomen zur apikalen Plasmamembran (Mohrmann *et al.*, 2002b).

Darüber hinaus ist Rab4 neben Rab11 auf *recycling endosomes* (RE) zu finden (Somsel und Wandinger-Ness, 2000; Sonnichsen *et al.*, 2000). Rab-Proteine, z.B. Rab4, -5 und -11, können auf den gleichen Zellorganellen lokalisiert sein, sich jedoch in separaten Membrandomänen befinden (Sonnichsen *et al.*, 2000; De Renzis *et al.*, 2002).

2.8.6 Rab8

Rab8 gehört zu jener Superfamilie, die auch Rab10 und Rab13 beinhaltet. Bei ihr handelt es sich um die nächsten Verwandten des Sec4p der Hefe (Chavrier *et al.*, 1993; Pereira-Leal und Seabra, 2001). Dieses wiederum ist das zuerst beschriebene Rab-Protein, das den Transport vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur Membran reguliert (Salminen und Novick, 1987; Walworth *et al.*, 1992). Rab8 und Rab13 spielen ebenso wie auch Sec4p eine Rolle beim polarisierten Membrantransport.

Rab8, welches eine Größe von 24 kDa aufweist, ist auf basolateralen *post*-Golgi-Vesikeln, *recycling endosomes*, in der *tight junction*-Region und der Plasmamembran lokalisiert (Huber *et al.*, 1993b; Lau und Mruk, 2003; Ang *et al.*, 2004).

Es galt als Regulator des basolateralen Transportes vom TGN zur Plasmamembran (Chen *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 1993b). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Rab8 nur als Regulator beim AP-1B-abhängigen Transport vom TGN zur basolateralen Membran eine entscheidende Rolle in polaren MDCK-Zellen zukommt (Ang *et al.*, 2003; Henry und Sheff, 2008).

Ebenfalls involviert ist Rab8 beim polaren Transport zur dendritischen Membran, bei der Aktin-abhängigen Bewegung von Melanosomen und bei der Zell-Zell-Adhäsion (Huber *et al.*, 1993a; Ang *et al.*, 2003; Powell und Temesvari, 2004; Chabrilat *et al.*, 2005; Hattula *et al.*, 2006).

In Fibroblasten vermittelt Rab8 den gerichteten Transport von VSV-G (Peranen *et al.*, 1996) und in Photorezeptorzellen der Retina den Transport von *post*-Golgi-Vesikeln, die neu gebildetes Rhodopsin transportieren (Deretic *et al.*, 1995).

Aktuelle Studien belegen, dass Rab8 auch bei Tumorzellen der Brust (MDA-MB-231-Zellen) eine Rolle im polaren vesikulären Transport von MT1-MMP (MT1-Matrix-Metalloproteinase), einer Metalloproteinase, zukommt, die ein Teil der invasiven Maschinerie von Tumorzellen ist. Die Überexpression der konstitutiv-aktiven Rab8-Mutante sowie siRNA-Experimente in diesen Zellen zeigen, dass Rab8 den Transport von MT1-MMP an die invasive Plasmamembran und somit die proinvasive Aktivität der Proteinase reguliert (Bravo-Cordero *et al.*, 2007).

Sato *et al.* konnten als erste eine Beteiligung von Rab8 am apikalen Transport *in vivo* nachweisen. So zeigten sie, dass es in Rab8-*knock-out*-Mäusen zu einer Fehlsortierung apikaler Peptidasen hin zu Lysosomen kommt. Dies führt zum Abbau der Peptidasen, wodurch es zu Verdauungs- und Nahrungsaufnahmeproblemen sowie schließlich infolge Unterernährung zum Tod der Mäuse kommt (Sato *et al.*, 2007).

2.8.7 Rab11A

Rab11A gehört neben Rab11B und Rab25 zur Rab11-Subfamilie (Bock *et al.*, 2001). Das Vorkommen von Rab25 beschränkt sich auf Epithelzellen (Goldenring *et al.*, 1993; Goldenring *et al.*, 1996), während Rab11A und Rab11B ubiquitär exprimiert werden. Rab11A, welches aus 216 Aminosäuren besteht und eine Größe von 24 kDa aufweist, wurde erstmals in neuronalen Membranfraktionen identifiziert und anschließend sowohl in nicht-polarisierten als auch polarisierten Zellen nachgewiesen (Kikuchi *et al.*, 1988; Chavrier *et al.*, 1990; Ohmori *et al.*, 1990). Es spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation intrazellulärer Transportprozesse, wie dem endosomalen *Recycling* internalisierter Transportproteine und Rezeptoren, der Phagozytose sowie der Translokation sekretorischer Vesikel (Ullrich *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 2000; de Graaf *et al.*, 2004). Darüber hinaus reguliert Rab11A die Proteinsortierung aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk bzw. aus degradativen Lysosomen in die *recycling endosomes* (Wilcke *et al.*, 2000; Peden *et al.*, 2004).

Durch die Analyse von RE konnte die Beteiligung von Rab11A an der Regulation des endosomalen *Recyclings* von Transportproteinen und Rezeptoren in polarisierten und nicht-polarisierten Zellen nachgewiesen werden (Ullrich *et al.*, 1996; Green *et al.*, 1997; Sonnichsen *et al.*, 2000). Rab11A ist in den RE lokalisiert, welche den Transferrin-Rezeptor zur Zelloberfläche transportieren. Die Überexpression der konstitutiv-aktiven Rab11-Mutante führt zu einer Inhibition des Austritts von *recycling endosomes* aus dem Endosomalen *Recycling*-Kompartiment (Wilcke *et al.*, 2000).

Neben der Assoziation von Rab11A in *recycling endosomes* konnte Rab11A auch im TGN sowie im Golgi-Apparat und in sekretorischen *post*-Golgi-Vesikeln lokalisiert werden (Urbe *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1998). Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A führt zu einer Akkumulation von TGN38, einem Markerprotein des *trans*-Golgi-Netzwerkes, in RE und zur Inhibition des endosomalen *Recyclings* von TGN38, das zwischen Plasmamembran und *trans*-Golgi-Netzwerk zirkuliert (Wilcke *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass Rab11A bei der Regulation des endosomalen *Recyclings* als Sortierprotein eine Rolle spielt.

Die Exozytose aus dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran wird ebenfalls von Rab11A reguliert, da die Überexpression der dominant-negativen Mutante die Translokation der beteiligten RE inhibierte (Chen *et al.*, 1998).

Darüber hinaus ist Rab11A an der Regulation des intrazellulären Transports des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin und des VSV-G aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran beteiligt (Chen *et al.*, 1998; Calhoun *et al.*, 1998; Lock und Stow, 2005). In gastrointestinalen und renalen Epithelzellen ist Rab11A in subapikalen Membranvesikeln lokalisiert und reguliert das endosomale *Recycling* zur apikalen Membran (Goldenring *et al.*, 1994; Casanova *et al.*, 1999).

2.8.8 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war die Aufklärung der zugrunde liegenden Sortier- und Transportmechanismen apikaler Proteine anhand der beiden Modellproteine SI und LPH in MDCK-Zellen. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich damit, neue Proteinkomponenten zu identifizieren und mitzuhelfen, ihre Funktion im Transport von SI und LPH zu charakterisieren.

Darüber hinaus stellte sich die Frage nach der Rolle endosomaler Kompartimente im apikalen Transport. Für den basolateralen Transport konnte anhand spezifischer Marker, so genannter Rab-Proteine, gezeigt werden, dass Endosomen in der Exozytose eine entscheidende Rolle spielen (Huber *et al.*, 1993b; Ang *et al.*, 2003; Lock und Stow, 2005; Babbey *et al.*, 2006). Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Aufklärung endosomaler Kompartimente anhand der Rab-4-, -8- und 11-Proteine im apikalen Transport. Neben der Charakterisierung endosomaler Kompartimente galt es, die Funktion dieser drei Proteine im Transport von SI und LPH zu entschlüsseln. Durch die Konstruktion von Fusionsproteinen konnte der Transport der verschiedenen Proteine *in vivo* untersucht werden. Durch Transfektion der cDNS dieser Konstrukte konnte sowohl in transient transfizierten COS-1-Zellen als auch in stabil exprimierenden MDCK-Zellen die Rolle von Rab4, -8 und -11 charakterisiert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Alpha-Kinase 1, eine neue Komponente im apikalen Proteintransport

Publikation 1:

Martin Heine, Catharina I. Cramm-Behrens, Athar Ansari, Hsueh-Ping Chu, Alexey Ryazanov, Hassan Y. Naim und Ralf Jacob;

α -Kinase 1, A New Component in Apical Protein Transport, *J. Biol. Chem.*, 2005 Jul 8; 280 (27): 25637-43

Durch Vesikel-Immunpräzipitation und MALDI-TOF-Analysen konnte in SI-tragenden Vesikeln (SAV) das Protein Alpha-Kinase 1 (ALPK-1) identifiziert werden, welches nicht in LPH-tragenden Vesikeln (LAV) vorkommt.

Alpha-Kinasen sind im Gegensatz zu konventionellen Kinasen in der Lage, Aminosäuren in α -Helices zu phosphorylieren, wodurch sie auch ihren Namen erhalten haben.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von ALPK-1 beim apikalen Transport *raft*-abhängiger Proteine am Beispiel der SI charakterisiert werden. Für diese Studien wurden neben Immunpräzipitation, *Western Blot*, konfokaler Mikroskopie und siRNA-Versuchen auch quantitative PCR-Analysen und Kinase-Assays durchgeführt.

Nach erfolgter Immunpräzipitation und Identifizierung der ALPK-1 in SAV wurde mit Hilfe von quantitativer RT-PCR und *Western-Blot*-Analysen ein möglicher Zusammenhang der ALPK-1 Assoziation mit SI und der Zelldifferenzierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Expression der mRNA von ALPK-1 in polaren MDCK- (Bell *et al.*, 2001) und humanen Caco-2-Zellen (Darmoul *et al.*, 1994) während der Polarisierung der Epithelzellen erfolgt.

Zur Charakterisierung der intrazellulären Lokalisation wurden ALPK-1 und Galaktosyltransferase (GT), ein TGN-Marker, in die eukaryotischen Expressionsvektoren pECFP-1 und pEYFP-1 kloniert, um den Transportweg im Zusammenhang mit der SI in COS-1-Zellen zu untersuchen. Die konfokalmikroskopischen Analysen zeigten neben vesikulären Strukturen der

ALPK-1 im Zytosol eine Konzentration des Proteins in der Nähe des Nukleus, die eine Koloalisation mit GT-YFP aufweist. Darüber hinaus konnten ALPK-1-positive Vesikel detektiert werden, die auch SI-YFP tragen, was den Rückschluss zulässt, dass beide Proteine über den gleichen sekretorischen Weg befördert werden.

Um die Rolle der ALPK-1 in SAV näher zu erforschen, wurde die Wirkung von ALPK-1 in immunpräzipitierten SAV untersucht. Anhand eines Kinase-Assays mit radioaktiv markiertem γ - ^{32}P -ATP und anschließender Auftrennung mittels SDS-PAGE konnte der Einbau des ^{32}P -Isotops bei vier Proteinen mit den Größen von 105, 50, 25 und 16 kDa gezeigt werden. Die 105 kDa große Proteinbande konnte mit Hilfe von MALDI-TOF- und *Western-Blot*-Analysen als Myosin 1a identifiziert werden.

Myosin 1a war schon zuvor als Komponente im gerichteten Transport SI-tragender Vesikel identifiziert worden (Jacob *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 2004). In den nächsten Experimenten sollte die Phosphorylierung von Myosin 1a nun näher charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Maximum der Phosphorylierung von Myosin 1a 20 min nach Verlassen des TGN erreicht und durch den Chelatbildner EDTA sowie den Calmodulin-Inhibitor Trifluorperazin (TFP) beeinträchtigt wird. Die Anwesenheit von Staurosporin hingegen zeigte keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität von ALPK-1. Bei Staurosporin handelt es sich um einen Inhibitor für konventionelle Kinasen, wohingegen Alpha-Kinasen eine Staurosporin-Insensitivität aufweisen und sich dadurch von konventionellen Proteinkinasen unterscheiden (Ryazanov *et al.*, 1997; Ryazanova *et al.*, 2001).

Zu klären bleibt, ob Myosin 1a direkt durch ALPK-1 phosphoryliert wird. Während es bei einer gemeinsamen Inkubation von ALPK-1-CFP und Myosin 1a-YFP zu einer Phosphorylierung von Myosin 1a kommt, führte die separate Inkubation beider Komponenten mit γ - ^{32}P -ATP zu keiner Phosphorylierung. Konfokalmikroskopische Analysen konnten darüber hinaus zeigen, dass ALPK-1 und Myosin 1a in gemeinsamen vesikulären Strukturen lokalisiert sind.

Die nachfolgenden siRNA- und Inhibierungsstudien sollten den Einfluss der ALPK-1 auf den Transport oder die Sortierung der SI näher analysieren. Hierbei konnten analoge Resultate zu den Kinase-Assays bei der Zugabe von TFP bzw. Staurosporin erzielt werden. Nur durch Zugabe des Calmodulin-Inhibitors wurde

der Transport der SI zur Zelloberfläche beeinträchtigt. In anschließenden Oberflächenexperimenten mit auf Filtereinsätzen gewachsenen, gegen ALPK-1 siRNA-transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des Transports der SI an die apikale Membran deutlich verringert wurde. Hierbei konnte keine Fehlsortierung an die basolaterale Membran festgestellt werden. Das weist darauf hin, dass sich die Reduzierung der ALPK-1-Expression auf den Transport, jedoch nicht auf den Sortiermechanismus auswirkt.

In diesen Studien konnte ein Zusammenhang von ALPK-1 sowohl mit Myosin 1a als auch der SI gezeigt werden. Der Einfluss der ALPK-1-Expression und der Myosin 1a-Phosphorylierung wurde mittels Vesikel-Immunpräzipitation von siRNA-transfizierten Zellen und einem anschließenden Kinase-Assay gezeigt.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die ALPK-1-Kinase in SAV identifiziert, die eine entscheidende Rolle beim Transport, jedoch nicht bei den Sortiermechanismen der SI spielt. Es handelt sich dabei um eine Staurosporin-insensitive Kinase, die in der Lage ist, Myosin 1a zu phosphorylieren.

3.2. Die Notwendigkeit von Galektin-3 für die apikale Proteinsortierung

Publikation 2:

Delphine Delacour, Catharina I. Cramm-Behrens, Hervé Drobecq, Andre Le Bivic, Hassan Y. Naim und Ralf Jacob;

Requirement for Galectin-3 in Apical Transport, *Curr. Biol.*, 2006 Feb21; 16 (4): 408-414

Mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Analysen sollten weitere Proteinkomponenten in SAV und LAV identifiziert werden. Dabei konnte in immunisolierten LPH-tragenden Vesikeln das Lektin Galektin-3 identifiziert werden. Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die Rolle von Galektin-3 im apikalen Transport von LPH aufzuklären.

Mit Hilfe von *Western-Blot*-Analysen und Elektronenmikroskopie konnte zunächst die spezifische Lokalisation in LAV bestätigt werden. Da es sich bei der LPH um ein *raft*-unabhängig transportiertes Protein handelt, sollte in der nächsten Analyse mittels Saccharosegradientenzentrifugation überprüft werden, ob Galektin-3 mit TX-100-unlöslichen Membranmikrodomänen, so genannten *detergent resistant membranes* (DRM; Tall *et al.*, 2003) , assoziiert oder ob es sich um ein Protein handelt, das spezifisch für den *raft*-unabhängigen Transport ist. Hier konnte gezeigt werden, dass Galektin-3 im Gegensatz zur SI und Caveolin, einem *raft*-Marker (Tall *et al.*, 2003), ebenso wie die LPH nicht *raft*-assoziiert ist.

Die nächsten Versuche konzentrierten sich auf die subzelluläre Charakterisierung von Galektin-3. Zunächst wurden Fusionsproteine von Galektin-3 und Rab11 mit den Expressionsvektoren pEYFP und pECFP generiert, welche dann für konfokalmikroskopische Studien in der nicht-polarisierten Zelllinie COS-1 exprimiert wurden. Galektin-3 wies sowohl eine zytosolische Verteilung als auch eine Lokalisation in vesikulären Strukturen auf. In diesen vesikulären Strukturen konnte eine Kolokalisation von Galektin-3 mit Rab11, jedoch nicht mit dem lysosomalen Membran-Protein lamp-2 und dem *trans*-Golgi-Marker GT detektiert werden. Rab11 wurde hier als Indikator für *recycling endosomes* verwendet, die im apikalen Transport involviert sind (Prekeris *et al.*, 2000). Die Transfektion mit SI

und LPH ergab bei anschließenden FRET-Analysen eine räumliche Nähe für Galektin-3 und LPH, jedoch nicht für SI.

Die nachfolgenden Studien in polarisierten MDCK-Zelllinien mit endogenem Galektin-3 konnten ebenfalls eine spezifische Lokalisation mit LPH im subapikalen Bereich zeigen.

Bei Galektin-3 handelt es sich um ein zytosolisches Protein, welches über einen unkonventionellen Weg transportiert wird. In den nächsten Experimenten sollte geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt Galektin-3 mit LAV, die das TGN verlassen haben, fusioniert. Mit Hilfe von *Western Blots* und Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass die Assoziation von Galektin-3 mit LAV 5 min nach Verlassen des TGN erfolgt und das Maximum bei 10 min erreicht wird. Auch hier konnte keine Assoziation mit SAV detektiert werden, was ebenfalls darauf hindeutet, dass Galektin-3 nur im Transport *raft*-unabhängiger Proteine eine Rolle spielt.

Die nächsten Studien sollten nachweisen, ob Galektin-3 an der zytosolischen oder luminalen Seite der Vesikel bindet. Die Analysen von immunpräzipitierten LAV nach Triton X-100- und Proteinase-K-Behandlung sowie SDS-PAGE und *Western Blot* zeigten, dass Galektin-3 an der luminalen Seite von *post*-Golgi-Vesikeln bindet.

Diese Ergebnisse, zusammen mit den FRET-Analysen, warfen die Frage auf, ob Galektin-3 direkt mit der LPH im Lumen des Vesikels assoziiert ist. Um dies zu klären, wurden Co-Immunpräzipitationen von isolierter SI und LPH aus stabil exprimierten MDCK-Zelllinien in An- oder Abwesenheit von Glukose, Galaktose oder Laktose durchgeführt. Galaktose und Laktose wirkten hier als Inhibitoren der vermuteten Assoziation von Galektin-3 und LPH, wohingegen in Anwesenheit von Glukose Galektin-3 mit LPH co-immunpräzipitiert werden konnte. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl Laktose als auch Galaktose um die Bindung mit Galektin-3 an die LPH konkurrieren. Auch in diesen Studien konnte keine Co-Präzipitation mit SI in MDCK-Zellen detektiert werden.

Die Rolle von Galektin-3 als Rezeptor im apikalen Transport wurde neben der LPH für zwei weitere Proteine, den Neurotrophin-Rezeptor p75 und das apikale Glykoprotein gp114, untersucht. Auch hier konnte nach erfolgter Immunpräzipitation von gp114 und p75 und anschließende *Western-Blot*-Analysen

Galektin-3 detektiert werden. Nach Co-Immunpräzipitationen unter den gleichen Versuchsbedingungen wie für LPH und SI konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Galektin-3 in Anwesenheit von Glukose an gp114 und p75 bindet. Das bedeutet, dass Galektin-3 an die apikalen Glykoproteine LPH, p75 und gp114 auf eine Glukose-abhängige Weise bindet.

In abschließenden Versuchen sollte der Einfluss von Galektin-3 auf den Transport bzw. die Sortierung apikaler Proteine betrachtet werden. Dies wurde durch Transfektion mit siRNA, das heißt eine Reduzierung von Galektin-3 auf Protein- und mRNA-Ebene, in Oberflächenexperimenten untersucht. Die Oberflächenverteilung von LPH, p75 und SI auf der apikalen bzw. basolateralen Membran von siRNA-transfizierten MDCK-LPH_{myc}⁻, MDCK-p75- und MDCK-SI-YFP-Zellen wurde durch Inkubation auf Filtereinsätzen und die Oberflächenpräzipitation von LPH, p75 und SI bestimmt. Die Repression von Galektin-3 führte zu einer Fehlsortierung von LPH und p75 zur basolateralen Membran, wohingegen kein Einfluss auf den Transport der SI zu erkennen war. Diese Ergebnisse konnten mittels konfokaler Mikroskopie bestätigt werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine neue Komponente, Galektin-3, im *raft*-unabhängigen Transport identifiziert. Die aufgeführten Daten lassen den Schluss zu, dass Galektin-3 eine wichtige Rolle bei der Sortierung *raft*-unabhängiger apikal sortierter Proteine spielt.

3.3 Endosomen sortieren apikale Proteine in verschiedene Vesikelpopulationen

Publikation 3:

Catharina Cramm-Behrens, Martina Dienst, Ralf Jacob;

Endosomes Sort Apical Cargo into Distinct Transport Carriers; *Traffic, submitted*

Nach der Identifizierung einzelner Komponenten – Galektin-3 bei der LPH und ALPK-1 bei der SI – im Transport zur apikalen Membran, ging es in dieser Arbeit darum, herauszufinden, ob der Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran über endosomale Kompartimente verläuft.

Die Initialhypothese einer Sortierung apikaler und basolateraler Proteine im TGN wurde inzwischen erweitert. Zusätzlich kommt eine weitere Sortierung für einen Teil der Proteine nach Verlassen des TGN in Frage. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass SI und LPH das TGN in einer gemeinsamen Vesikelpopulation verlassen und erst nach Verlassen des TGN eine Auftrennung in zwei unterschiedliche Populationen erfolgt (Jacob und Naim, 2001). Einzelne endosomale Kompartimente werden in der Zelle durch spezifische kleine GTPasen, so genannte Rab-Proteine charakterisiert (siehe Abschnitt 2.7). Aufgrund dessen wurden drei verschiedene Rab-Proteine als Marker für spezifische endosomale Kompartimente in dieser Arbeit eingesetzt. Es handelt sich hierbei um Rab4, eine GTPase, die im Golgi-Bereich und an den *early endosomes* lokalisiert ist, um Rab8, das bei der Exozytose basolateraler Proteine eine Rolle spielt und im *recycling compartment*, auch *common endosomes* genannt, zu finden ist. Rab11, als dritter Marker, ist in der Exo- und Endozytose involviert, u.a. ist es in so genannten ARE (*apical recycling endosomes*) lokalisiert.

Der erste Teil dieser Arbeit konzentriert sich auf die konfokalmikroskopische Analyse in den unpolaren COS-1- sowie polarisierten MDCK-Zellen.

In einem ersten Versuch wurden Fusionsproteine erstellt, um Analysen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie durchführen zu können. Dafür wurden Rab4, -8 und -11 in die Expressionsvektoren pECFP-C1 und pDsRedMonomer-C1 kloniert, um

dann den Transportweg von Rab4, -8 und -11 im Zusammenhang mit den beiden Modellproteinen SI und LPH zu untersuchen.

Konfokalmikroskopische Analysen in COS-1-Zellen konnten eine Kolokalisation von Rab4, -8 und -11 sowohl mit der SI als auch der LPH detektieren, wodurch erste Rückschlüsse auf eine Rolle von Rab4, -8 oder -11 im apikalen Transport der SI und LPH gezogen werden konnten.

Sowohl SI-YFP als auch LPH-CFP werden nach der mannosereichen Glykosylierung im ER zum Golgi-Apparat befördert, komplex glykosyliert, dann an die Zelloberfläche weitertransportiert und dort verankert. Die Fluoreszenzsignale der SI- und LPH-Fusionsproteine konzentrieren sich im zentralen Bereich der Zelle, und zwar im Golgi-Apparat. Von dort aus verteilen sich sowohl bei SI-YFP als auch LPH-CFP die Transportvesikel über die gesamte Zelle, welche als signalstarke Punkte erkennbar sind. In diesen konnte eine Kolokalisation mit den Rab-Proteinen gezeigt werden.

Weitere Kotransfektionen mit dominant-negativen Mutanten von Rab4-, Rab8- oder Rab11-CFP sowohl mit SI-YFP als auch LPH-YFP ergaben eine Veränderung der Vesikelanzahl von SI und LPH gegenüber der Transfektion mit den nicht-mutierten Varianten der Rab-Fluoreszenzproteine. Interessant zu beobachten war eine Erhöhung der Vesikelanzahl bei Kotransfektion mit Rab8_{T22N}-CFP, wohingegen sich bei Kotransfektionen mit Rab4_{S22N} und Rab11_{S25N} die Vesikelanzahl verringerte.

Weitere konfokalmikroskopische Analysen in stabilen, polarisierten MDCK-SI-YFP- und MDCK-LPH_{myc}-Zellen führten auch hier zu dem Ergebnis, dass eine Kolokalisation zwischen Rab4, -8 und -11 sowohl mit SI als auch LPH vorhanden ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transfektion der dominant-negativen Rab8-Mutante zu einer Vesikelakkumulation von SI und LPH führt.

Nachdem eine Kolokalisation mit SI und LPH gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage nach der Rolle der Rab-Proteine im apikalen Transport bei der SI bzw. der LPH.

Anhand von siRNA-Transfektionen, welche die Expression der jeweiligen Rab-Proteine verringerte, wurde biochemischen Analysen mit Hilfe radioaktiver Markierung durchgeführt.

Stabil exprimierende MDCK-LPH- und MDCK-SI-Zellen wurden dafür in Filtereinsätzen inkubiert und mit siRNA gegen das jeweilige Rab-Protein transfiziert. Die Verteilung von LPH und SI auf der apikalen bzw. der basolateralen Membran wurde dann durch Oberflächenimmunpräzipitation ermittelt.

Hier konnte eine drastische Reduzierung sowohl des SI- als auch des LPH-Anteils an der apikalen Membran nach Repression von Rab8 festgestellt werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine intrazelluläre Reduktion der einzelnen Rab-Proteine zu keiner Fehlsortierung an die basolaterale Membran führt.

Die bisherigen Daten weisen darauf hin, dass SI und LPH beide auf ihrem Weg zur apikalen Membran mit allen drei Rab-Proteinen assoziieren, darüber hinaus wurde gezeigt, dass Rab8 eine Rolle beim Transport spielt.

Mittels Immunpräzipitation von *post*-Golgi-Vesikeln sollte nun die zeitliche Assoziation der einzelnen Rab-Proteine mit SAV und LAV nach Verlassen des TGN analysiert werden. Hier wurden zunächst die Beobachtungen der konfokalen Mikroskopie bestätigt. So waren alle drei Rab-Proteine in SI- und LPH-Vesikeln zu finden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine zeitliche Abfolge von Rab4- zu Rab8- und später Rab11-positiven Kompartimenten nach Verlassen des TGN erfolgt. Interessant hierbei ist die zeitgleiche Abfolge für LAV und SAV, was auf einen gemeinsamen Transport durch endosomale Kompartimente schließen lässt.

Somit demonstrieren diese Daten, dass SI und LPH nach Verlassen des TGN weitere Kompartimente auf ihrem Weg zur apikalen Membran gemeinsam passieren und die Sortierung der beiden Proteine nicht im TGN, sondern in einem späteren endosomalen Kompartiment stattfindet.

3.4. Unveröffentlichte Daten

In diesem Abschnitt werden zusätzliche Ergebnisse aufgeführt, die Grundlage der 3. Publikation gewesen sind.

3.4.1 Konfokalmikroskopische Analysen

Um die subzelluläre Lokalisation von Rab4, -8 und -11 im Zusammenhang mit der LPH und SI mittels konfokaler Lasermikroskopie beobachten zu können, wurden COS-1-Zellen nach der DEAE-Dextran-Methode mit Fusionsproteinen aus SI und LPH mit YFP und Rab4, -8 und -11 mit CFP transfiziert. Die Transfektion erfolgte zum einen mit den Wildtypvarianten – Rab4WT-, -8WT- und -11WT-CFP (Abb. 3.1A) – und zum anderen mit den dominant-negativen Mutanten Rab4_{S22N}⁻, Rab8_{T22N}⁻ und Rab11_{S25N}⁻-CFP mit SI-YFP bzw. LPH-YFP (Abb. 3.1B).

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie ausgewertet.

Wie in Abb. 3.1 erkennbar, konzentrieren sich LPH und SI im zentralen Bereich des Zellkörpers, der hier dem Kompartiment des GA entspricht, sowie in vesikulären Strukturen. In einigen Zellen ist darüber hinaus eine Lokalisation in der Zellmembran erkennbar. In den vesikulären Strukturen konnte eine Kolokalisation von Rab4WT-, Rab8WT- sowie Rab11WT-CFP sowohl mit der SI-YFP als auch der LPH-YFP detektiert werden. Vergleicht man die Transfektion der dominant-negativen Mutante mit den Wildtyp-Aufnahmen für Rab8, so ist eine Erhöhung der Vesikelanzahl sowohl bei SI als auch LPH erkennbar. Diese Beobachtung konnte für Rab4 und Rab11 nicht getroffen werden. Die konfokalen Bilder dienen des Weiteren der Vesikelzählung für Figur 1D+E, Publikation 3.

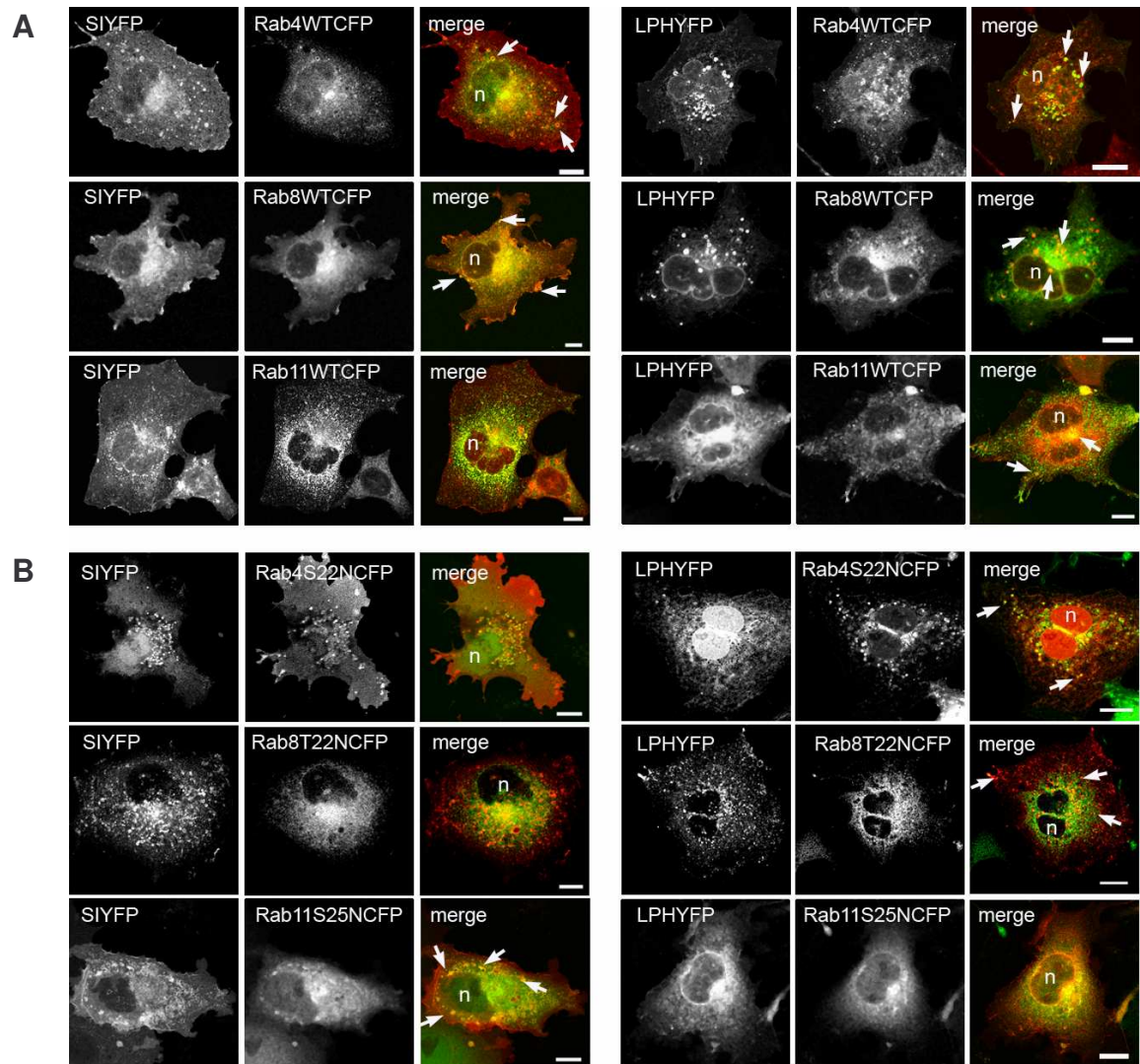


Abb. 3.1: Kolokalisation von Rab4, -8 und -11 mit SI und LPH in COS-1-Zellen

48 Stunden nach Kotransfektion wurden die Zellen 4 Stunden bei 20 °C inkubiert, um die Vesikel im TGN anzusammeln. Es erfolgte eine zehninminütige Inkubation bei 37 °C, um die Vesikel aus dem TGN zu entlassen.

A) Transfektion der Wildtypvarianten von Rab4, -8 und -11 mit SI und LPH

B) Transfektion der dominant-negativen Varianten mit SI und LPH

Die Darstellung von SI und LPH erfolgt in rot, die der Rab-Proteine in grün. Pfeile sowie gelbe Bereiche kennzeichnen Kolokalisationen. Der Größenbalken entspricht einer Länge von 10 µm. Der Buchstabe n kennzeichnet den Zellkern.

3.4.2 Intrazelluläre Lokalisation von endogenen Rab-Proteinen in mit SI-YFP oder LPHmyc transfizierten COS-1-Zellen

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen sollte der Zusammenhang von endogenen Rab-Proteinen mit SI und LPH bestätigt werden. Dafür wurden auf Deckgläschen ausgesäte COS-1-Zellen nach der DEAE-Dextran-Methode mit SI-YFP bzw. LPHmyc transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte eine Immunfärbung mit spezifischen Primärantikörpern, gerichtet gegen Rab4, -8, -11 bzw. den myc-tag. Die anschließende Färbung mit den fluoreszierenden Zweitantikörpern Alexa Fluor 633 und Alexa Fluor 488 ermöglichte die Analyse im konfokalen Lasermikroskop.

Dies bestätigte die Daten der transienten Transfektionen der Expressionsvektoren der Rab-Proteine (Abb. 3.2). Es konnte für alle drei Rab-Proteine eine Kolo-kalisation mit sowohl der SI-YFP als auch der LPHmyc in vesikulären Strukturen detektiert werden. Diese wurde im übereinander gelegten Bild (*merge*) in Abb. 3.2 mit Hilfe von Pfeilen markiert.

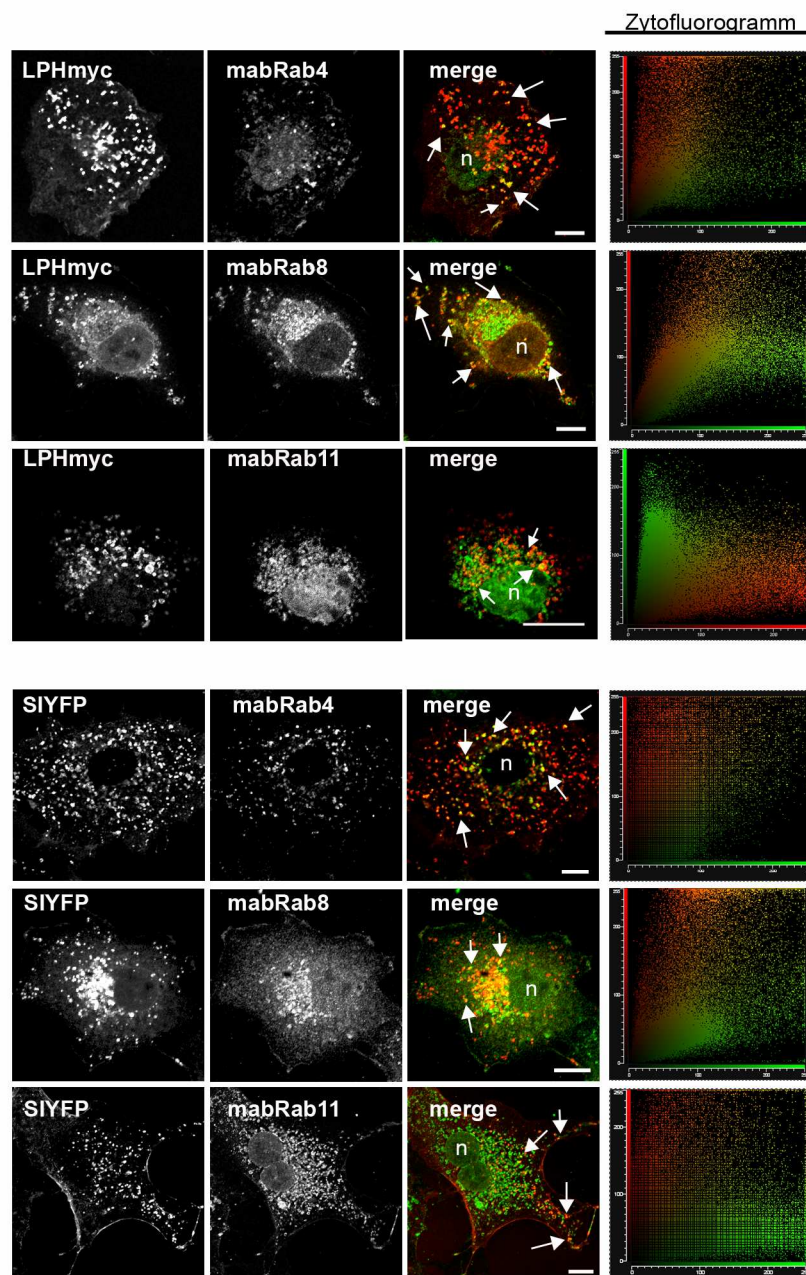


Abb. 3.2: Lokalisation von endogenen Rab-Proteinen in transfizierten COS-1-Zellen

COS-1-Zellen wurden mit SI-YFP oder LPHmyc transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion 4 Stunden lang bei 20 °C im TGN geblockt und für 10 min bei 37 °C aus dem TGN entlassen. Die Immunfluoreszenz erfolgte mit anti-Rab4, -8, -11 und -myc sowie den Zweitantikörpern Alexa Fluor 633 und 488. LPH und SI sind in rot dargestellt, Rab4, -8 und -11 in grün. Das Zytofluorogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der Intensitätswerte von SI / LPH mit Rab4, -8 und -11. n, Zellkern, Größenbalken 10 μm

3.4.3 Quantitative Auswertung der Kolokalisationsstudien

Die quantitative Auswertung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 3.2 und 3.3 (Figur S1, Publikation 3) erfolgte mit der Leica-SP2-Software. Mit Hilfe eines Zytofluorogramms wurde sie graphisch aufbereitet. Die Anzahl der Pixel der roten und grünen Intensitäten wurde dabei in einem zweidimensionalen Histogramm als *Scattergram* dargestellt, welches aus den beiden Detektionskanälen des konfokalen Mikroskops erzeugt wird. Dabei stellt jede Achse die Intensität der einzelnen Farbe (Kanäle) dar. Das kolokalisierte Areal wird durch die Region definiert, in der beide Kanäle über dem roten und grünen Schwellwert (*threshold*) liegen (siehe Methodenteil Abb.8.1).

Für Abbildung 3.2 konnte in dieser Region eine teilweise vorhandene Überlappung der beiden Detektionskanäle für Rab4, -8 und -11 mit SI bzw. LPH der konfokalmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden. Der Bereich der Kolokalisation liegt auf der 45°-Achse des Diagramms (Abb.8.1). Die quantitative Auswertung dieses Bereiches zeigt eine Kolokalisation von ca. 34 % der LPH- und 28 % SI-Proteinmenge mit 25 % der Gesamtproteinmenge von Rab8. Für Rab4 und Rab11 hingegen ist eine geringere Kolokalisation zu detektieren. Rab4 zeigt eine Kolokalisation von 18 % der Gesamtproteinmenge von LPH mit 23 % des Rab4-Anteils, wohingegen nur 13 % des LPH-Proteinanteils mit 17 % Rab11 kolokalisieren. Für SI konnte die quantitative Auswertung zeigen, dass 19 % SI-Gesamtmenge mit 25 % Rab4 und 17 % Rab11 mit 14 % SI kolokalisieren.

In Abbildung 3.3 ist das Zytofluorogramm von EEA1, Rab7 bzw. Lamp-1 und SI-YFP bzw. LPHmyc (B) dargestellt. Die Darstellung zeigt eine deutliche Trennung der beiden Detektionskanäle. Der kolokalisierte Anteil zwischen den Proteinen liegt bei allen Aufnahmen unter 2,5 %. Diese Ergebnisse untermauern die biochemischen Daten der Publikation 3, Figur 5 (TGN-Exit). Bei EEA1 handelt es sich um einen spezifischen Marker für *early endosomes*, welche bei der Endozytose eine wichtige Rolle spielen. Lamp-1 und Rab7 wurden hier als Marker für LE und Lysosomen verwendet. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die SI als auch die LPH nicht in Kompartimenten der Endozytose und des degradativen Abbaus zu finden sind.

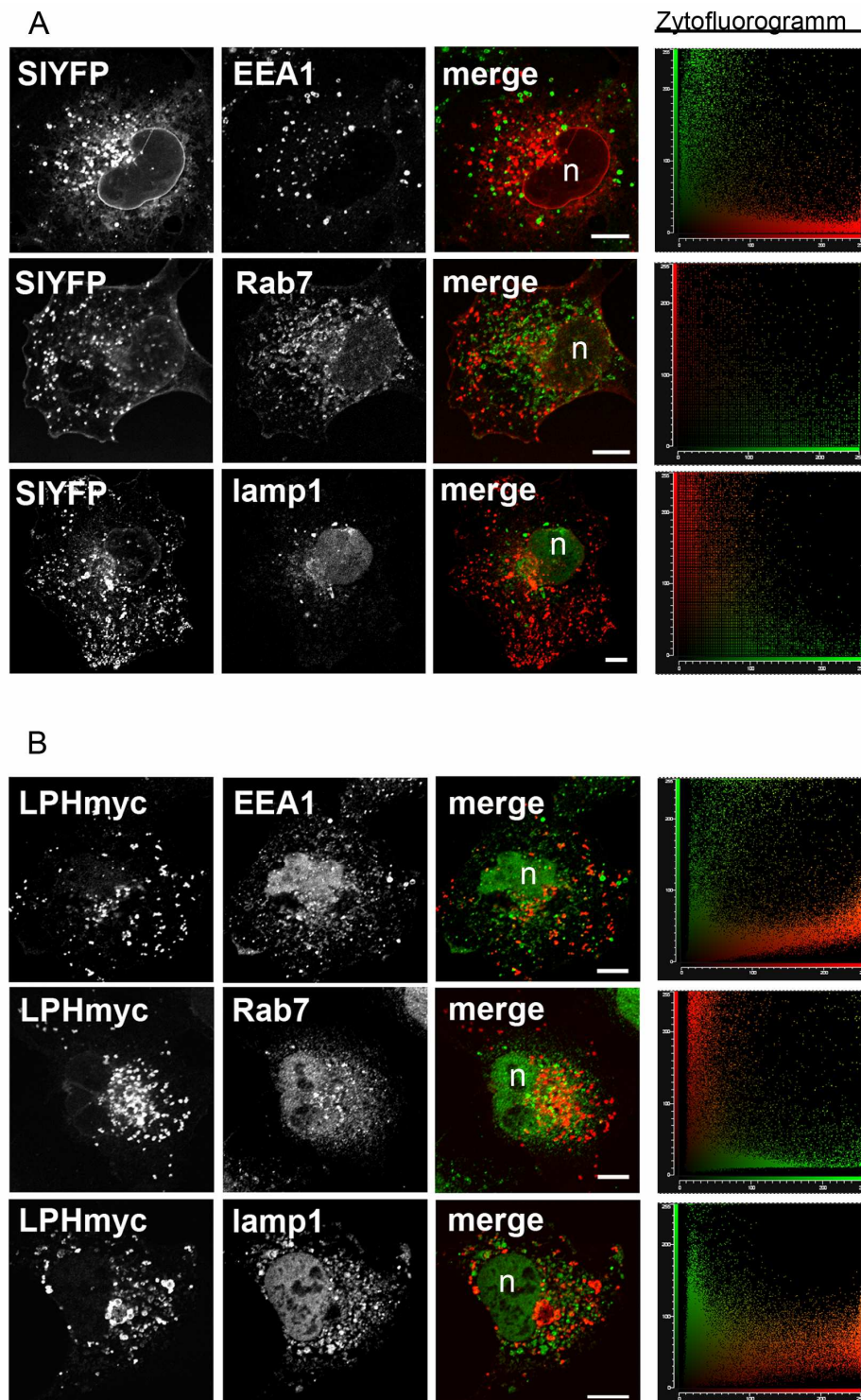


Abb. 3.3: Subzelluläre Verteilung von SI-YFP und LPHmyc in COS-1-Zellen

SI-YFP (A) und LPHmyc (B) wurden transient in COS-1-Zellen transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion mit Antikörpern gegen EEA1, Rab7, lamp-1 und myc sowie den Zweitantikörpern Alexa Fluor 633 und 488 immungefärbt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Zytofluorogramms (rechte Spalte). LPH und SI sind in rot dargestellt, die der übrigen endogenen Markerproteine in grün. n: Nukleus; Größenbalken: 10 μm

3.4.4 Der Einfluss der Rab-Proteine auf den sekretorischen Transport von SI und LPH in COS-1-Zellen

Um den Einfluss der dominant-negativen Mutanten von Rab4_{S22N}, -8_{T22N} und -11_{S25N} auf den Transport der SI und LPH zu analysieren, wurde in diesem Experiment mit Hilfe radioaktiver L-[³⁵S]-Methionin-Markierung eine Oberflächenimmunpräzipitation durchgeführt.

Dazu wurden COS-1-Zellen mit dem jeweiligen Wildtyp oder der dominant-negativen Mutante von Rab4, -8 oder -11 zusammen mit SI-WT / LPHmyc transfiziert.

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für sechs Stunden mit L-[³⁵S]-Methionin inkubiert. Danach erfolgte eine Oberflächenimmunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen LPH und SI. Nach der Präzipitation der Proteine an der Oberfläche wurde eine weitere Immunpräzipitation mit dem Überstand durchgeführt. Dies ermöglichte die intrazellulär verbliebenen Proteine zu präzipitieren.

Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphoimagers und der *GelPro-Analyzer-4.5*-Software analysiert.

Das Verhältnis von radioaktiv markiertem Protein an der Zelloberfläche zum intrazellulär verbliebenen Protein wurde quantifiziert und in Abb. 3.4 dargestellt. Verglichen wurde hierbei der prozentuale Proteinanteil von SI bzw. LPH an der Zelloberfläche von Rab-Wildtyp mit jenem von mit mutiertem Rab transfizierten Zellen.

Es ist zu erkennen, dass die dominant-negativen Mutanten von Rab4 und Rab11 keinen signifikanten Einfluss auf die Transportkinetik von LPH oder SI haben. Die Quantifizierung der Transfektion von Rab8_{T22N} hingegen zeigt an der Zelloberfläche eine Reduzierung um 25 % im Vergleich zum Wildtyp.

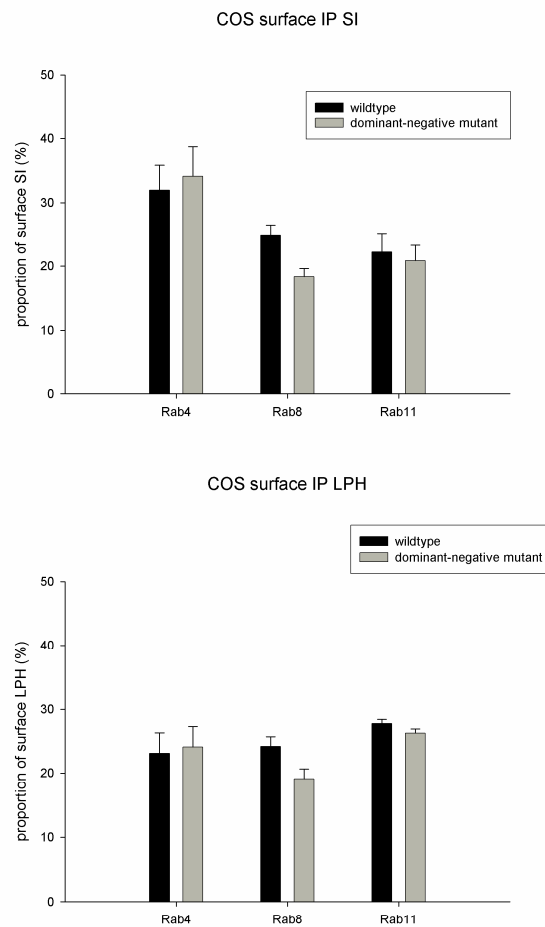


Abb. 3.4: Oberflächenimmunpräzipitation in COS-1-Zellen

COS-1-Zellen wurden mit dem jeweiligen Rab-Wildtyp oder der dominant-negativen Mutante zusammen mit LPH bzw. SI transfiziert. Nach 48 Stunden wurde eine Oberflächenimmunpräzipitation durchgeführt. Die Zellen wurden dafür 6 Stunden lang mit L-[³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert. Mit mAb gegen LPH und SI erfolgte die Immunpräzipitation des Oberflächen-Anteils an LPH- und SI-Proteinen, sowie der verbliebenen Menge im Zellinnern. Dargestellt wurde die Relation des prozentualen Proteinanteils an der Oberfläche ($\text{Proteinanteil Oberfläche} / (\text{Proteinanteil Oberfläche} + \text{verbliebenes Protein im Lysat})$) vom WT im Vergleich zur Mutante

3.4.5 Biochemische Transportanalysen von SI und LPH in MDCK-Zellen

Mittels konfokaler Mikroskopie und biochemischen Analysen konnte in Publikation 3 eine Kolo-kalisation von Rab4, -8 und -11 mit SI und LPH dargestellt werden. Im TGN-*Exit*-Experiment (Figur 5, Publikation 3) konnte die chronologische Abfolge der Lokalisation von Rab4, -8 und -11 mit LPH und SI gezeigt werden. Die Ergebnisse warfen die Frage auf, wann SAV und LAV die apikale Membran nach Verlassen des TGN erreichen. Für diese Analyse wurden Oberflächenimmunpräzipitationen nach vorangegangenen TGN-Block in stabil exprimierenden SI-YFP- und LPHpcDNA3-MDCK-Zellen durchgeführt.

Stabil exprimierende SI-YFP- und LPHpcDNA3-MDCK-Zellen wurden vier Stunden lang mit L-[³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert, im TGN sechs Stunden geblockt und für die in Abb. 3.5 gezeigten Zeitpunkte bei 37 °C inkubiert, um den Vesikeln das Verlassen des TGN zu erlauben. Eine anschließende Oberflächenimmunpräzipitation ermöglichte die Bestimmung des Zeitpunkts, an dem radioaktiv markierte SI- und LPH-Proteine die apikale Membran erreichen. So gelangt die LPH 20 min nach Verlassen des TGN an die apikale Membran (Abb.3.5), wobei nach 20 min erst ein sehr geringer Anteil von SI die apikale Membran erreicht. Hier ist erst nach 30 min eine klare Detektion an der Oberfläche möglich.

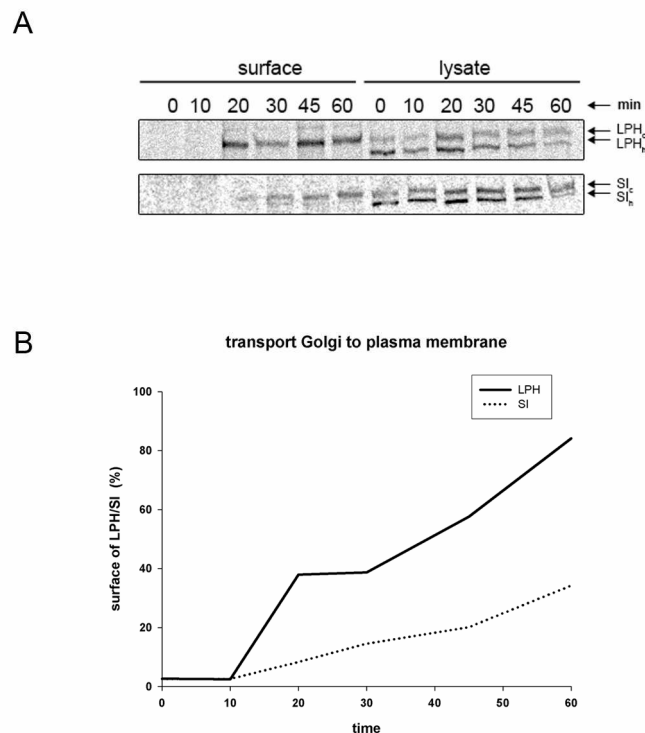


Abb. 3.5: Oberflächenimmunpräzipitation stabiler MDCK-Zelllinien

Stabil exprimierende SI-YFP- und LPHpcDNA3-MDCK-Zellen wurden fünf Tage nach Aussäen auf 6 *well* Filtereinsätzen eine Stunde in Methionin freiem Medium inkubiert, 4 Stunden bei 37 °C mit L-³⁵S-Methionin markiert und für weitere 6 Stunden bei 20 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für die angezeigten Zeitintervalle bei 37 °C erwärmt. Es folgte eine Oberflächenimmunpräzipitation von SI und LPH.

A) Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgte auf einem 6 % SDS-Polyacrylamidgel

B) Quantitative Auswertung der Oberflächenimmunpräzipitation. Dargestellt ist der apikale Anteil des Proteins zu der Gesamtmenge des jeweiligen Proteins ((apikaler Proteinanteil + intrazellulär verbliebenes Protein) / intrazelluläres Protein), welcher nach bestimmten Zeitintervallen nach TGN-*Exit* die apikale Oberfläche erreicht.

SI_c: komplex glykosylierte Form der SI; SI_h: mannosereiche Form; LPH_h: mannosereiche Form; LPH_c: komplex glykosylierte Form.

3.4.6 Quantitative Analyse des TGN-Exit-Experiments

In diesem Abschnitt wurden die Ergebnisse des TGN-Exit-Experiments, Figur 5b, Publikation 3 densitometrisch quantifiziert. Zur Analyse wurde die *GelPro-Analyzer-4.5*-Software verwendet.

Das TGN-Exit-Experiment an sich sollte Aufschluss geben, ob Rab4, -8 und -11 in einer zeitlichen Abfolge mit SI bzw. LPH nach Verlassen des TGN assoziieren. Dafür wurden wie beschrieben (Publikation 3) stabil exprimierende SI-YFP- und LPH_{myc}-MDCK-Zellen vier Stunden bei 20 °C im TGN geblockt und für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37 °C erwärmt, um den Austritt der Proteine aus dem TGN zuzulassen. Nach erfolgter Immunpräzipitation, SDS-PAGE und *Western Blots* mit spezifischen Antikörpern erfolgte die Analyse der *Blots*.

Für die quantitative Analyse wurden für jedes Rab-Protein vier Experimente durchgeführt. In Abbildung 3.6 erfolgte die graphische Darstellung der ermittelten Daten für LAV (A) und SAV (B).

Bei Betrachtung der Graphen kann man erkennen, dass auch hier eine chronologische Abfolge von SI und LPH mit Rab4, -8 und -11 zu erkennen ist. Der prozentuale Anteil von Rab4 ist vom Zeitpunkt 0-5 min, bezogen auf den gesamten Zeitverlauf, mit bis zu 32 % für SI und 28 % für LPH am höchsten. Rab8 hingegen ist vom Zeitpunkt 2,5 min nach TGN-Exit bis 7,5 min nach Verlassen am höchsten und der prozentuale Anteil fällt deutlich bei 10 min ab.

Rab11 ist in den ersten Minuten in nur sehr geringen Mengen (unter 4 %) in SAV und LAV vorhanden und steigt bei 5-10 min nach Verlassen des TGN deutlich an. Ab dem Zeitpunkt 15 min nach TGN-Exit ist Rab11 nur noch in geringfügigen Mengen (4-6 %) in SAV und LAV zu finden.

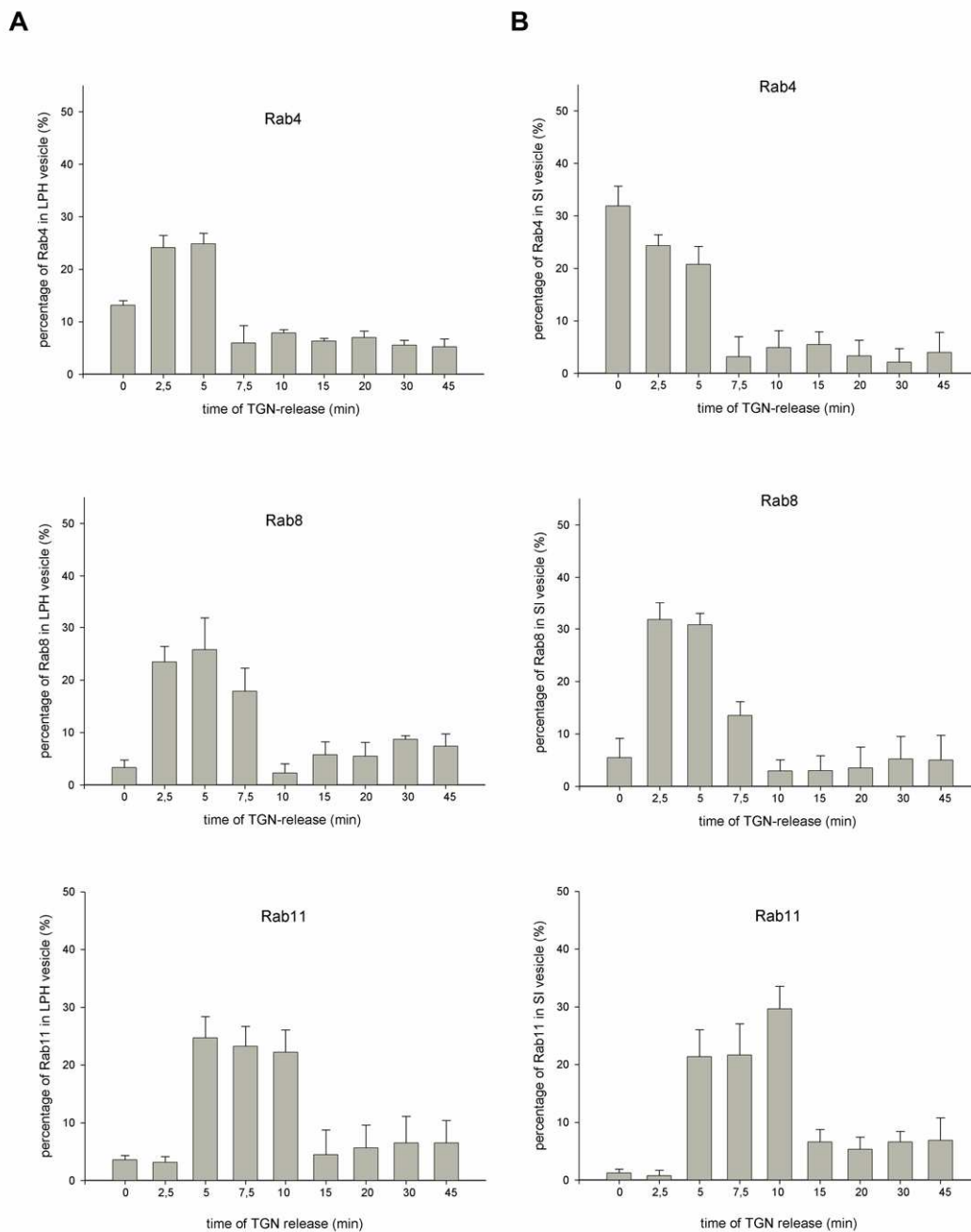


Abb. 3.6: Quantitative Analyse des TGN-Exit-Experiments

Die densitometrische Bestimmung von vier verschiedenen TGN-Exit-Experimenten für LAV und SAV erfolgte mit der *GelPro-Analyzer-4.5*-Software. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil der Rab-Proteine bezogen auf den gesamten Zeitverlauf von 0-45 min. A) Darstellung von Rab4, -8 und -11 in LPH-tragenden Vesikeln, B) Rab4, -8 und -11 in SI-tragenden Vesikeln

4. Übergreifende Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden als Modellsystem MDCK-Zellen verwendet, da sie wie Enterozyten polar aufgebaut sind und die beiden Modellproteine SI und LPH zu reifen Enzymen prozessieren können. Polare Zellen sind durch die Ausbildung zweier unterschiedlicher Domänen charakterisiert, welche sich deutlich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung unterscheiden. Der Aufbau und die Funktion der Plasmamembran werden über einen komplexen intrazellulären Transport von Glykoproteinen zu den spezifischen Organellen gewährleistet.

Das Thema der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Aufklärung einzelner Schritte im apikalen Proteintransport anhand von zwei Modellproteinen, der SI und der LPH.

Dabei wurden zum einen neu identifizierte Proteine sowie zum anderen auch einzelne endosomale Kompartimente, welche im apikalen Transport eine Rolle spielen, charakterisiert.

Endosomale Kompartimente

Das TGN galt in früheren Studien als Sortierstelle neu synthetisierter sekretorischer Proteine. Bekannt ist, dass die Sortierung apikaler und basolateraler Proteine im TGN stattfindet, wobei heute nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil des Sortiermechanismus erst nach Verlassen des TGN abläuft (Rodriguez-Boulau und Nelson, 1989; Wandinger-Ness *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 2001; Hua *et al.*, 2006). Das Augenmerk dieser Arbeit liegt auf dem apikalen Transport und den zugrunde liegenden Sortier- und Transportmechanismen.

Für den apikalen Transport werden von Jacob und Naim zwei unterschiedliche Wege postuliert. Sie demonstrierten, dass die beiden apikal sortierten Modellproteine LPH und SI das TGN in einer gemeinsamen Vesikelpopulation verlassen, sich dann in zwei unterschiedliche Populationen (SAV und LAV) aufteilen und entlang von Zytoskelettkomponenten zur apikalen Membran

transportiert werden (Jacob und Naim, 2001). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass dies für die SI *raft*-assoziiert und für LPH nicht-*raft*-assoziiert erfolgt.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob die beiden Modellproteine auf dem Weg vom TGN zur apikalen Membran endosomale Kompartimente durchqueren. Sie zeichnen sich durch spezifische Markerproteine aus, zu welchen u.a. die Rab-GTPasen zählen. Rab-Proteine besitzen eine charakteristische Lokalisation und sind in allen Kompartimenten und Organellen zu finden. Sie binden reversibel über Lipidanker an die zytosolische Seite von intrazellulären Membranen und rekrutieren spezifische Effektorproteine, über die sie die Bildung, den Transport und die Fusion von Vesikeln beeinflussen (Zerial und Stenmark, 1993; Ali und Seabra, 2005; Schwartz *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels konfokalmikroskopischer Analysen Kolokalisationen von Rab4, -8 und -11 sowohl mit der *raft*-assoziierten SI als auch der nicht-*raft*-assoziierten LPH detektiert werden. Dies konnte sowohl in nicht-polarisierten COS-1- als auch polarisierten MDCK-Zellen beobachtet werden.

Studien in MDCK-Zellen zeigen für Rab8 eine perinukleäre und basolaterale Lokalisation (Huber *et al.*, 1993b; Ren *et al.*, 1996; Ang *et al.*, 2003). Nähere Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich nur im geringen Maße um eine Lokalisation von Rab8 in Golgi-Zisternen handelt. Vielmehr geht man bei der perinukleären Lokalisation von *common recycling endosomes* (CRE) aus, da in der Immunfluoreszenz eine Kolokalisation von Rab8 mit in RE akkumuliertem Transferrin-Rezeptor nachgewiesen wurde (Ang *et al.*, 2003).

Rab11a ist im Golgi-Apparat, TGN sowie in RE in nicht-polarisierten Zellen und in polarisierten Zellen ausschließlich in RE lokalisiert (Lapierre *et al.*, 2003).

Rab4 befindet sich in MDCK-Zellen im Golgi-Apparat, EE und CE (van der Sluijs *et al.*, 2001; Mohrmann *et al.*, 2002a).

Diese Lokalisationen lassen den Schluss zu, dass unterschiedliche endosomale Kompartimente eine Rolle im Transport von SI und LPH spielen könnten.

Mittels biochemischer Analysen sollten die konfokalmikroskopischen Ergebnisse verifiziert werden. Die Immunpräzipitationen von SI- und LPH-tragenden Vesikeln

bestätigten die vorangegangenen Studien zur Kolo-kalisation. Rab4, -8 und -11 konnten hier in immunpräzipitierten SAV und LAV identifiziert werden.

Mit Hilfe einer Inkubation von MDCK-Zellen bei 20 °C, welche eine Entlassung neu synthetisierter Proteine aus dem TGN verhindert und dem darauf folgenden TGN-Exit bei 37 °C wurde untersucht, ob eine zeitlichen Abfolge von SAV und LAV bei der Passage von Rab4-, -8- und -11-positiven Kompartimenten vorhanden ist.

Die Studien wiesen darauf hin, dass die SI und LPH erst nach Verlassen des TGN mit Rab8 und -11 kolo-kalisiert sind. Dies lässt sich daraus schließen, dass der verwendete TGN-Marker p230 zu diesen Zeitpunkten nicht in den immunpräzipitierten Vesikeln zu finden ist. Für Rab4 hingegen ist nicht klar, ob es mit dem TGN assoziiert ist und zusammen mit der SI und LPH das TGN verlässt, da es bei Zeitpunkt 0 in SAV und LAV gemeinsam mit p230 zu finden ist oder ob es nach dem TGN lokalisiert ist. Um die Lokalisation von Rab4 zu klären, sind weitere Experimente erforderlich.

Zudem zeigten die Experimente, dass SAV und LAV für die ersten Minuten erst ein Rab4-, dann ein Rab8- und nach 7,5-10 min ein Rab11-positives Kompartiment durchqueren. Interessant hierbei ist die gleiche chronologische Abfolge für die einzelnen Rab-Proteine bei LAV und SAV. Diese Ergebnisse konnten zudem durch eine quantitative Analyse verifiziert werden.

Dies lässt die Hypothese zu, dass sowohl *common endosomes* als auch *apical recycling endosomes* durchquert werden könnten.

Die chronologische Abfolge deutet darauf hin, dass SI und LPH nach Verlassen des TGN gemeinsam endosomale Kompartimente durchqueren und erst nachfolgend in diesen eine Auftrennung in SAV und LAV erfolgt. Untermuert wird dies durch die konfokalmikroskopischen Beobachtungen der Dreifach-Transfektion in COS-1-Zellen. Hier wurde gezeigt, dass SI und LPH in gemeinsamen Vesikeln mit Rab4, -8 oder -11 assoziiert sind. Frühere Studien zeigten, dass eine Auftrennung in SAV und LAV in den unpolaren COS-1-Zellen erst 10 Minuten nach Verlassen des TGN erfolgt (Jacob und Naim, 2001).

Die Tatsache, dass es sich bei der LPH um ein nicht-*raft*-assoziiertes und bei der SI um ein *raft*-assoziiertes Protein handelt, steht dazu in keinem Widerspruch. So

zeigten Jacob und Naim, dass SI und LPH beim Austritt aus dem TGN zwar in gemeinsamen Transportbehältern, jedoch in spezifischen Membrandomänen lokalisiert sind und sich aus diesen abknospen (Jacob und Naim, 2001). Hierbei handelt es sich bei der SI um spezifische lipidreiche Domänen.

Es besteht die Hypothese, dass *lipid rafts* im TGN mit ihren Proteinen so genannte Sortierplattformen bilden, sich abknospen und ihre Proteine apikal transportieren. *Rafts* sind dabei nicht nur im TGN, sondern auch in *recycling endosomes* sowie an der Plasmamembran zu finden (Gagescu *et al.*, 2000; Mobius *et al.*, 2003). SI und LPH könnten somit im TGN in für sie spezifische Membranbereiche innerhalb einer Vesikelpopulation sortiert werden, das TGN gemeinsam verlassen und sich dann in *raft*- oder nicht-*raft*-abhängige Vesikelpopulationen auftrennen. Auf zwei unterschiedlichen Wegen erreichen sie dann ihre Zielmembran (Jacob und Naim, 2001; Jacob *et al.*, 2003).

Neben der Identifizierung einzelner endosomaler Kompartimente stellte sich die Frage nach dem Einfluss der hier verwendeten Rab-Proteine auf den Transport von SI und LPH.

Die erste Funktion von Rab8 wurde im Vesikeltransport vom TGN zur basolateralen Membran beschrieben (Huber *et al.*, 1993b). So inhibierten Rab8-spezifischen Peptide den basolateralen Transport von VSV-G. In Neuronen spielt Rab8 ebenfalls eine Rolle beim Transport zur dendritischen Membran, welche mit der basolateralen Membran gleichgesetzt werden kann. Reprimiert man Rab8 mit Hilfe spezifischer *antisense*-Oligonukleotide, so ist der dendritische Transport viraler Glykoproteine selektiv inhibiert. Diese Studien wurden sowohl in entwickelten als auch in sich entwickelnden Neuronen durchgeführt (Huber *et al.*, 1993a; Huber *et al.*, 1995). In MDCK-Zellen konnte die Rolle von Rab8 im basolateralen Transport spezifiziert werden. Rab8 reguliert selektiv den AP-1B-abhängigen Transport und nicht, wie zunächst angenommen, den gesamten basolateralen Transport (Ang *et al.*, 2003). In unpolarisierten Fibroblasten-Zellen ist Rab8 ebenfalls am gerichteten Transport von VSV-G beteiligt (Peranen *et al.*, 1996).

Rab11 ist an der Regulation des intrazellulären Transports der basolateral sortierten Proteine VSV-G und Ecadherin vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur

Plasmamembran beteiligt (Chen *et al.*, 1998; Calhoun *et al.*, 1998; Lock und Stow, 2005). Darüber hinaus führten die Ergebnisse von Wilcke *et al.* zu der Hypothese, dass Rab11A in der Regulation des endosomalen *Recyclings* als Sortierprotein eine Rolle spielt (Wilcke *et al.*, 2000). Die Überexpression der dominant-negativen Mutante von Rab11A führte zu einer Akkumulation von TGN38 in RE und zur Inhibition des endosomalen *Recyclings* von TGN38, das zwischen dem TGN und der Plasmamembran zirkuliert.

Rab4 spielt eine wichtige Rolle in den Prozessen der Endozytose, indem es den Transport des Transferrin-Rezeptors von den *common endosomes* zur apikalen Membran kontrolliert (Mohrmann *et al.*, 2002b). Die Aufgabe von Rab4 in der Exozytose ist weitgehend unerforscht.

Um die Funktion der Rab-Proteine im apikalen Transport von SI und LPH aufzuklären, wurden biochemische Studien mit Hilfe von siRNA und den dominant-negativen Rab-Mutanten durchgeführt. Die Ergebnisse weisen auf eine Rolle von Rab8 im apikalen Transport hin. In den Experimenten konnte eine Reduzierung des SI- und LPH-Anteils an der apikalen Membran in MDCK-Zellen bzw. an der Plasmamembran in COS-1-Zellen gezeigt werden. Studien in MDCK-Zellen konnten bisher nur eine Funktion von Rab8 im basolateralen Transport zeigen. In jüngsten Studien mit *knock-out* Mäusen konnte erstmals eine Rolle von Rab8 im apikalen Transport belegt werden (Sato *et al.*, 2007).

Diskutieren lässt sich der Effekt der dominant-negativen Mutante sowie der siRNA-Ergebnisse. Betrachtet man die Auswirkung auf den Transport, so könnte man darauf schließen, dass Rab8 nicht unbedingt für den apikalen Versand notwendig ist, da noch ein großer Anteil von SI und LPH an die apikale Membran von MDCK-Zellen bzw. an die Plasmamembran von COS-1-Zellen gelangt. Frühere Studien weisen ebenfalls nur geringe Effekte der dominant-negativen Mutanten und siRNA-Transportstudien von Rab8 auf (Peranen *et al.*, 1996; Schuck *et al.*, 2007). Zurzeit haben verschiedene Hypothesen zur Rolle der Rab-Proteine bestand. Zum einen geht man davon aus, dass Rab-Proteine sich untereinander in ihren Aufgaben ersetzen können und somit austauschbar sein könnten (Nuoffer *et al.*, 1994; Barral *et al.*, 2002; Schluter *et al.*, 2004). Eine weitere Theorie lautet, dass sie parallel beim Transport und der Sortierung agieren

können. Studien von Schuck beweisen, dass die einzelne Transfektion von Rab8- oder Rab10-siRNA zu einer vergleichsweise geringen Fehlsortierungsrate (ca. 30 %) von VSV-G an die apikale Membran führten, wohingegen die gemeinsame Repression von Rab8 und Rab10 einen deutlicheren Effekt (40-45 %) auf die Sortierung hatte. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Rab-Proteine eine ähnliche Funktion aufweisen und miteinander kooperieren könnten. Rab8 und Rab10 gehören zu einer gemeinsamen Superfamilie, zu denen auch Rab13 zählt. Diese Superfamilie zeigt die größte Homologie zu Sec4 (Chavier *et al.*, 1993; Pereira-Leal und Seabra, 2001). Sec4 besitzt unterschiedliche Funktionen beim Transport vom TGN zur Membran (Salminen und Novick, 1987; Walworth *et al.*, 1992). In höheren Organismen könnten nun mehrere Rab-Proteine die Rolle von Sec4 übernehmen, wozu Rab8 und Rab10 zählen würden.

Die für Rab4 und Rab11 durchgeführten Oberflächenimmunpräzipitationen konnten keinen signifikanten Einfluss auf den Transport und die Sortierung von SI und LPH zeigen. Das bedeutet, dass sie zwar in SAV und LAV zu finden sind, jedoch keine essentielle Rolle bei der Sortierung und dem Transport einzunehmen scheinen.

Komponenten des apikalen Transports

Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle beim gerichteten Proteintransport. Für die Sortierung basolateraler Proteine sind so genannte Adapterproteine zuständig (Matter *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1993; Matter und Mellman, 1994; Monlauzeur *et al.*, 1995; Bonifacino und Dell'Angelica, 1999; Simmen *et al.*, 2002). Für den gerichteten Transport zu den Lysosomen ist der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor essentiell (Griffiths *et al.*, 1988).

Es wurden bisher einige Rezeptoren diskutiert, die an der Sortierung apikaler Proteine beteiligt sein könnten. Hierbei wurden zuckerbindende Rezeptoren postuliert, die im apikalen Transport eine Rolle spielen und direkt mit Zuckerresten von Glykoproteinen interagieren (Fiedler und Simons, 1995; Yeaman *et al.*, 1997; Alfalah *et al.*, 1999). Das Lektin VIP36 (*vesicular integral protein*) konnte in DRM

(*detergent resistance membranes*) identifiziert werden und galt als erster potentieller Rezeptor für den apikalen Transport (Fiedler *et al.*, 1994). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation durch eine Überexpression bedingt wurde. Endogenes VIP36 ist im *cis*-Golgi zu finden und spielt eine Rolle im frühen Transport zwischen ER und GA, jedoch nicht als essentieller Sortierungsrezeptor beim Transport vom TGN zur Plasmamembran (Fullekrug *et al.*, 1999). Ein weiterer Kandidat, der im Transport von *raft*-assoziierten GPI-verankerten Proteinen involviert ist, ist das MAL-Protein. Wie frühere Studien gezeigt haben, spielt MAL im apikalen Transport vom *raft*-assoziierten HA eine entscheidende Rolle (Puertollano *et al.*, 1999; Martin-Belmonte *et al.*, 2000). So führt die Reduzierung von MAL, mit Hilfe spezifischer *antisense*-Oligonukleotide, zu einer basolateralen Fehlsortierung von HA, die Lokalisation von HA an der apikalen Membran und in *rafts* deutlich verringert wird (Puertollano *et al.*, 1999).

Darüber hinaus wurde eine neue Familie der Lektine identifiziert, die eine Rolle im apikalen Transport aufweist. Hierbei handelt es sich um die Familie der Galektine. Galektin-4 konnte als Lektin identifiziert werden, welches in HT-29-Zellen und in den Enterozyten des Schweinedarms mit *lipid rafts* assoziiert ist (Danielsen und van Deurs, 1997; Delacour *et al.*, 2005). Die Reduzierung der Galektin-4-Expression beeinträchtigte sowohl die Bildung von *rafts* als auch den apikalen Transport (Delacour *et al.*, 2005).

Galektin-3

Bei der Analyse von SI- und LPH-tragenden Vesikeln konnte Galektin-3 als Lektin in LPH-tragenden Vesikeln identifiziert werden. Neben der Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Analysen wurden diese Ergebnisse durch die konfokale Lasermikroskopie und Elektronenmikroskopie verifiziert. Es handelt sich bei Galektin-3 um ein Protein, welches einen unkonventionellen Transportweg einschlägt. Galektin-3 konnte neben einer zytoplasmatischen Lokalisation in intrazellulären *post*-Golgi-Strukturen identifiziert werden. Es stellte sich die Frage,

wann die Assoziation von Galektin-3 mit LAV erfolgt. Hier wurde gezeigt, dass Galektin-3 10 min nach Verlassen der LPH aus dem TGN mit LAV fusioniert. Darüber hinaus konnte die direkte, Glukose-abhängige Interaktion von Galektin-3 mit LPH, p75NTR und pg114 nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte die Verringerung der Genexpression von Galektin3 eine Fehlsortierung von LPH, pg114 und p75 von der apikalen zur basolateralen Membran. Dies lässt den Schluss zu, dass Galektin-3 eine wichtige Rolle im Sortierprozess von *raft*-unabhängig transportierten Proteinen spielt. Galektin-3 könnte als apikaler Sortierrezeptor fungieren, der nicht-*raft*-assoziierte Proteine in apikale *post*-Golgi-Vesikel sortiert.

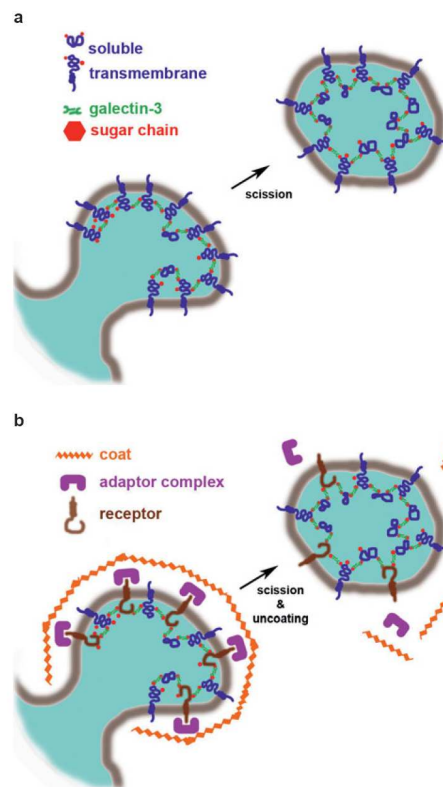


Abb. 4.1: Modelle für den Sortierprozess von Galektin-3 in Epithelzellen

A) Oligomerisiertes Galektin-3 sorgt als Lektin für die Akkumulation von membrangebundenen und löslichen Proteinen. Dadurch wird die Membrankrümmung induziert und das Vesikel kann sich abschnüren.

B) Transmembranrezeptoren *clustern* mit Galektin-3 und induzieren die Bildung eines Vesikel-Mantels (*coat*). Dieser *coat* führt ebenfalls zur Membrankrümmung und der Abschnürung des Vesikels.

(Delacour und Jacob, 2006)

Die Tatsache, dass Galektin-3 LAV-spezifisch ist und mit der LPH 10 min nach Verlassen des TGN assoziiert, lässt zusammen mit der Beobachtung, dass LAV in den ersten 10 min endosomale Rab4-, -8- und -11-positive Kompartimente durchqueren (Publikation 3), die Vermutung zu, dass Galektin-3 an dem Herauslösen von LPH aus der gemeinsamen Vesikelpopulation beteiligt sein könnte. Galektin-3 unterscheidet sich von den übrigen Galektinen dadurch, dass es in der Lage ist, multimere Komplexe auszubilden (Barondes *et al.*, 1994; Hikita *et al.*, 2000). Die Oligomerisierung von Polypeptiden in so genannte *cluster* spielt für den apikalen Transport eine wichtige Rolle und ist an der Ausbildung apikaler Vesikel beteiligt. (Paladino *et al.*, 2004). Delacour *et al.* konnten in weiterführenden Studien zeigen, dass die Ausbildung von multimeren Komplexen von Galektin-3 für den apikalen Transport nicht-*raft*-assoziierter Proteine essentiell ist (Delacour *et al.*, 2007). Das Modell in Abbildung 4.1 beschreibt zwei unterschiedliche Theorien der Vesikelausbildung, an der Galektin-3 beteiligt sein könnte. Zum einen könnte oligomerisiertes Galektin-3 für eine Akkumulation von membrangebundenen und löslichen Proteinen sorgen. Diese Akkumulation würde die Membrankrümmung induzieren, welche die Abschnürung des Vesikels von der Donormembran und den Transport zur Akzeptormembran zur Folge hätte (Abb. 4.1A). Abbildung 4.1B beschreibt die zweite Möglichkeit der Vesikelausbildung unter Beteiligung von Galektin-3. Um ein Transportvesikel herzustellen, binden Hüllproteine (*coat*-Proteine) an die Donormembran und deformieren die Membran derart, dass sich eine Knospe ausbildet. Die zu transportierende Proteine werden dann spezifisch in die entstehenden Vesikel aufgenommen. Galektin-3 *clustert* in diesem Fall mit Transmembranrezeptoren und löslichen Proteinen (Abb.4.1B), welche wiederum mit spezifischen Hüllproteinen Komplexe ausbilden (Ausbildung eines Vesikelmantels). Dieser Vesikelmantel führt zur Krümmung der Membran, die sich dann zur Knospe ausbildet und zur Vesikelabschnürung führt.

Alpha-Kinase 1

In der hier vorliegenden Studie konnte ein weiteres Protein identifiziert werden, welches die bisherigen Resultate zweier unterschiedlicher Transportwege von SI und LPH untermauert.

Es wurde eine spezifische Assoziation von ALPK-1 mit immunpräzipitierten SAV jedoch nicht mit LAV gezeigt. Bei der Alpha-Kinase 1 handelt es sich um ein bisher wenig bekanntes Protein, welches zu der erst vor einigen Jahren entdeckten Familie der Alpha-Kinasen zählt.

Neben der ALPK-1 konnte vor kurzem eine weitere Alpha-Kinase identifiziert werden, die in Golgi-ähnlichen Strukturen von *Dictyostelium* nachgewiesen wurde. Die katalytische Domäne dieser Von-Willebrand-Faktor A- (VwKA-) Kinase liegt, ebenso wie bei ALPK-1, im C-Terminus (Betapudi *et al.*, 2005).

Die Assoziation von ALPK-1 mit SI-positiven vesikulären Strukturen konnte in konfokalmikroskopischen Analysen bestätigt werden.

Alpha-Kinasen besitzen charakteristische Merkmale, durch die sie sich von anderen konventionellen Kinasen unterscheiden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Insensitivität gegenüber Staurosporin nachgewiesen, durch welche sich Alpha-Kinasen deutlich von den konventionellen Kinasen abgrenzen. Bei Staurosporin handelt es sich um einen wirkungsvollen Inhibitor der Klasse der Adenosintriphosphat- (ATP-) abhängigen Proteinkinasen.

Proteinkinasen modifizieren andere Proteine, indem sie bestimmte Aminosäuren auf deren Oberfläche mit einer Phosphatgruppe verknüpfen. Diese eingeführte Phosphatgruppe verändert die biologischen Eigenschaften dieser Proteine, wodurch sowohl die Enzymaktivität als auch die Bindung an andere regulatorische Moleküle reguliert werden können.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass es sich bei ALPK-1 um eine Kinase handelt, welche in der Lage ist, Myosin 1a zu phosphorylieren. Das Motorprotein Myosin 1a wurde zuvor schon als Komponente des Transports der SI identifiziert (Jacob *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 2004). Die Assoziation von ALPK-1 mit Myosin 1a konnte darüber hinaus in konfokalmikroskopischen Analysen verifiziert werden.

Bekannt ist, dass die Funktion von Myosin-Motorproteinen durch Phosphorylierung beeinflusst werden kann (Zot *et al.*, 1992; Swanljung-Collins und Collins, 1992; Egelhoff *et al.*, 1993; Wilkinson *et al.*, 2005).

Dies konnte für das Modellsystem der SI näher charakterisiert werden. Die Rolle der ALPK-1 beim Transport von SI im Zusammenhang mit Myosin 1a wurde dabei in biochemischen Analysen näher untersucht. Die Herunterregulierung der ALPK-1-Genexpression mit Hilfe von siRNA führte zu einer Reduzierung des phosphorylierten Myosin 1a-Anteils in SAV, wodurch die Transporteffizienz der SI zur apikalen Membran verringert wurde. Beobachtet wurde dabei, dass es zu keiner Fehlsortierung an die basolaterale Membran gekommen ist. Das legt den Schluss nahe, dass die ALPK-1 keine Rolle im Sortierprozess sondern im Transportmechanismus spielt.

Neben der ALPK-1 ist eine weitere Kinase bekannt, die eine Rolle im Proteintransport spielt. Es handelt sich dabei um die TRPM-7 / ChK1-Kinase, welche in der Lage ist, Annexin-1 zu phosphorylieren. Annexin-1 spielt insbesondere als Verbindungsmolekül mit anderen Proteinen und Membranen eine Rolle im Proteintransport (Dorovkov und Ryazanov, 2004).

Die Identifizierung von ALPK-1 in SAV 20 min nach Verlassen des TGN zusammen mit der Beobachtung, dass Annexin A2 20 min nach TGN-Exit mit SAV assoziiert (Jacob *et al.*, 2004) unterstützt neben den hier gezeigten Ergebnissen, dass SI und LPH sich erst in einem endosomalen Kompartiment auftrennen und dann auf zwei unterschiedlichen für sie spezifische Wege an die apikale Membran gelangen.

Ausblick

Für die genauere Identifizierung des Kompartiments, in welchem die Auftrennung in SAV und LAV erfolgt, könnten Studien mit dem Transferrin-Rezeptor als auch dem plgA-Rezeptor weitere Hinweise geben. Epithelzellen besitzen, wie schon beschrieben, zwei unterschiedliche Arten von *recycling endosomes*. Die *common recycling endosomes* (CRE oder auch CE genannt), welche als Hauptsortierort für apikale und basolaterale Proteine gelten, und die ARE, welche im Transport apikal orientierter Proteine, z.B. des plgA-Rezeptor eine Rolle spielen. Der Transferrin-Rezeptor (TfR) gelangt über BEE zu den CE, und vermutlich über weitere Endosomen, die AEE, an die Zelloberfläche. Der plgA-Rezeptor (plgAR) hingegen wird über BEE und CE zu den ARE an die apikale Membran transportiert. In den CE treffen somit endozytiertes IgA und Transferrin von der apikalen oder basolateralen Membran aufeinander und werden von dort weiter sortiert. Darüber hinaus sind Rab11 und Myosin Vb mit ARE assoziiert und nicht mit den Transferrin-rezyklierenden CE.

Jedoch wird zur Zeit auch diskutiert, ob es sich bei CE und ARE nicht um ein einzelnes tubuläres und in unterschiedliche Domänen unterteiltes Kompartiment handelt (Futter *et al.*, 1998; Verges *et al.*, 1999; Somsel und Wandering-Ness, 2000). Ultrastrukturelle Studien könnten hier Aufschluss geben.

Die genauere Identifizierung des endosomalen Kompartiments, in dem ALPK-1 mit SI und Galektin-3 mit LPH assoziiert, wird, neben der Identifizierung weiterer Proteinkomponenten im gerichteten apikalen Transport, Gegenstand künftiger Studien sein.

5. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Dissertation war zum einen die Identifizierung von Proteinen, welche für den Transport apikal sortierter Proteine, wie der Laktase-Phlorizin-Hydrolase und der Saccharase-Isomaltase, essentiell sind. Zum anderen galt das Hauptaugenmerk der Charakterisierung endosomaler Kompartimente im gerichteten apikalen Proteintransport.

Im Gegensatz zur LPH basiert der apikale Sortiervorgang der SI auf ihrer Assoziation mit Sphingolipid und Cholesterol-reichen Membranmikrodomänen (*raft*-abhängiger Transport). Es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass für SI und LPH zwei unterschiedliche Vesikelpopulationen im apikalen Transport existieren (Jacob und Naim 2001). Die SI und LPH verlassen das TGN hierbei in einer gemeinsamen Vesikelpopulation und trennen sich nach dem TGN-Exit in SAV und LAV auf. Entlang der für sie spezifischen Zytoskelettkomponenten gelangen sie dann an die apikale Membran.

In Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Proteine identifiziert werden, die einen Einfluss auf den Transport der SI bzw. der Sortierung der LPH haben. ALPK-1 konnte einzig in SI- und Galektin-3 spezifisch in LPH-tragenden Vesikeln isoliert werden. Die Unterdrückung der Galektin-3-Expression führte zu einer Fehlsortierung der LPH von der apikalen zur basolateralen Membran (Delacour *et al.*, 2006).

Die Reduzierung der ALPK-1-Expression auf der anderen Seite zeigte einen Einfluss auf die Transportkinetik der SI und reduzierte den Transport der SI an die apikale Membran. Des Weiteren konnte ALPK-1 als eine Kinase identifiziert werden, die das Motorprotein Myosin 1a phosphoryliert (Jacob *et al.*, 2003; Heine *et al.*, 2005).

Die Studien zur Charakterisierung endosomaler Kompartimente wurden mit Hilfe der Proteine Rab4, -8 und -11 durchgeführt. Diese zeigten, dass der Transport vom TGN zur Plasmamembran sowohl für die SI als auch die LPH über Rab4-, -8- und -11-positive endosomale Kompartimente verläuft. Die chronologische Abfolge der Assoziation von SI und LPH nach TGN-Exit mit Rab4, -8 und -11 sowie die konfokalmikroskopischen Analysen lassen den Rückschluss zu, dass SI und LPH gemeinsam diese Kompartimente durchlaufen und ihre Auftrennung in SAV und

LAV erst dort erfolgt. Bei der Auftrennung nicht-*raft*-assoziierter Proteine spielt das Lektin Galektin-3 eine zentrale Rolle. Zudem konnte durch siRNA-vermittelte Genrepression von Rab8 ein Einfluss auf die Transportkinetik von SI und LPH gezeigt werden. In diesen Versuchen kam es zu einer Reduzierung des Anteils beider Proteine an der apikalen Membran.

6. Summary

The content of this study was on one hand the identification of proteins which are essential for the transport of apically sorted proteins. On the other hand, the emphasis was laid on the characterization of endosomal compartments in apical transport. Therefore, two model proteins were used, the sucrase-isomaltase and lactase-phlorizin-hydrolase.

In contrast to LPH, SI associates on the passage to the apical membrane with sphingolipid and cholesterol enriched lipid microdomains or lipid rafts. It had already been demonstrated that SI and LPH exit the TGN in one vesicle population, followed by the segregation into two different populations after TGN-release (Jacob und Naim 2001). Then, they are transported along specific cytoskeletal components to the plasma membrane.

In the present work two proteins were identified which play a role in the transport of SI or in apical sorting of LPH. ALPK-1 was identified in immunisolated SI-associated vesicles, while galectin-3 was isolated from LPH-associated vesicles. Knockdown of galectin-3 had a significant influence on the sorting of non raft associated membrane proteins. In the absence of galectin-3 these apical glycoproteins were missorted from the apical to the basolateral membrane (Delacour *et al.*, 2006).

Moreover, the specific reduction of ALPK-1 expression had a strong influence on the intracellular trafficking of SI and results in a significant decrease in the apical delivery of this enzyme. Furthermore, ALPK-1 was identified as a kinase which is able to phosphorylate the motor protein myosin 1a (Jacob *et al.*, 2003; Heine *et al.*, 2005).

Studies to characterize endosomal compartments were performed with Rab4, -8 and -11 proteins as endosomal markers. The investigations have shown that SI and LPH traverse through Rab4, -8 and -11 positive endosomes before they reach the apical surface. Knockdown of Rab8 has shown a significant influence on the transport kinetics of SI and LPH. In these experiments the transport of SI and LPH to the apical membrane was reduced, thereby indicating that Rab8 regulates *post* Golgi trafficking of apical glycoproteins. Based on the chronology in monitoring SI and LPH positive vesicles after TGN-release combined with confocal microscopy studies, we came to the conclusion that both hydrolases traverse these compartments together, while their separation takes place thereafter. A central role in this endosomal separation mechanism of non raft associated proteins is played by the lectin galectin-3.

7. Literaturverzeichnis

1. Alfalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K. P., Naim, H., Naim, H. Y. (1999). O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase- isomaltase through association with lipid rafts. *Curr.Biol.* 9, 593-596.
2. Ali, B. R. und Seabra, M. C. (2005). Targeting of Rab GTPases to cellular membranes. *Biochem.Soc.Trans.* 33, 652-656.
3. Almkvist, J. und Karlsson, A. (2004). Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj.J.* 19, 575-581.
4. Ang, A. L., Folsch, H., Koivisto, U. M., Pypaert, M., Mellman, I. (2003). The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J.Cell Biol.* 163, 339-350.
5. Ang, A. L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L. J., Pypaert, M., Warren, G., Mellman, I. (2004). Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J.Cell Biol.* 167, 531-543.
6. Babbey, C. M., Ahktar, N., Wang, E., Chen, C. C., Grant, B. D., Dunn, K. W. (2006). Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the Cell* 17, 3156-3175.
7. Bacher, G., Lutcke, H., Jungnickel, B., Rapoport, T. A., Dobberstein, B. (1996). Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting. *Nature* 381, 248-251.
8. Bacon, R. A., Salminen, A., Ruohola, H., Novick, P., Ferro-Novick, S. (1989). The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: the Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. *J.Cell Biol.* 109, 1015-1022.
9. Barbero, P., Bittova, L., Pfeffer, S. R. (2002). Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J.Cell Biol.* 156, 511-518.
10. Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A., Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J.Biol.Chem.* 269, 20807-20810.
11. Barral, D. C., Ramalho, J. S., Anders, R., Hume, A. N., Knapton, H. J., Tolmachova, T., Collinson, L. M., Goulding, D., Authi, K. S., Seabra, M. C. (2002). Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J.Clin.Invest* 110, 247-257.
12. Bastaki, M., Braiterman, L. T., Johns, D. C., Chen, Y. H., Hubbard, A. L. (2002). Absence of direct delivery for single transmembrane apical proteins or their "Secretory" forms in polarized hepatic cells. *Molecular Biology of the Cell* 13, 225-237.
13. Bell, A. W., Ward, M. A., Blackstock, W. P., Freeman, H. N., Choudhary, J. S., Lewis, A. P., Chotai, D., Fazel, A., Gushue, J. N., Paiement, J., Palcy, S., Chevet, E., Lafreniere-Roula, M., Solari, R., Thomas, D. Y., Rowley, A., Bergeron, J. J. (2001). Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins. *J.Biol.Chem.* 276, 5152-5165.
14. Benting, J. H., Rietveld, A. G., Simons, K. (1999). N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft- associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J.Cell Biol.* 146, 313-320.
15. Beranger, F., Paterson, H., Powers, S., de Gunzburg, J., Hancock, J. F. (1994). The effector domain of Rab6, plus a highly hydrophobic C terminus, is required for Golgi apparatus localization. *Mol.Cell Biol.* 14, 744-758.

16. Betapudi, V., Mason, C., Licate, L., Egelhoff, T. T. (2005). Identification and Characterization of a Novel Alpha Kinase with a vWFA-like Motif Localized to the Contractile Vacuole and Golgi Complex in *Dictyostelium discoideum*. *Molecular Biology of the Cell*.
17. Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77, 1496-1500.
18. Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., Scheller, R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-841.
19. Boll, W., Wagner, P., Mantei, N. (1991). Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase- phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am.J.Hum.Genet.* 48, 889-902.
20. Bonifacino, J. S. und Dell'Angelica, E. C. (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J.Cell Biol.* 145, 923-926.
21. Bouma, M. E., Beucler, I., Pessah, M., Heinzmann, C., Lusi, A. J., Naim, H. Y., Ducastelle, T., Leluyer, B., Schmitz, J., Infante, R. (1990). Description of two different patients with abetalipoproteinemia: synthesis of a normal-sized apolipoprotein B-48 in intestinal organ culture. *J.Lipid Res.* 31, 1-15.
22. Bourne, H. R., Sanders, D. A., McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125-132.
23. Bravo-Cordero, J. J., Marrero-Diaz, R., Megias, D., Genis, L., Garcia-Grande, A., Garcia, M. A., Arroyo, A. G., Montoya, M. C. (2007). MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *EMBO J.* 26, 1499-1510.
24. Brennwald, P. und Novick, P. (1993). Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* 362, 560-563.
25. Brown, D. A., Crise, B., Rose, J. K. (1989). Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 245, 1499-1501.
26. Brown, D. A. und London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J.Biol.Chem.* 2000.Jun.9;275(23):17221-4. 275, 17221-17224.
27. Brown, D. A. und Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
28. Brown, P. S., Wang, E., Aroeti, B., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Dunn, K. W. (2000). Definition of distinct compartments in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for membrane-volume sorting, polarized sorting and apical recycling. *Traffic.* 1, 124-140.
29. Bucci, C. und Chiariello, M. (2006). Signal transduction gRABs attention. *Cell Signal.* 18, 1-8.
30. Bucci, C., Lutcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C. B., Simons, K., Zerial, M. (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett.* 366, 65-71.
31. Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.

32. Burton, J. L., Slepnev, V., De Camilli, P. V. (1997). An evolutionarily conserved domain in a subfamily of Rabs is crucial for the interaction with the guanyl nucleotide exchange factor Mss4. *J.Biol.Chem.* 272, 3663-3668.
33. Calhoun, B. C., Lapierre, L. A., Chew, C. S., Goldenring, J. R. (1998). Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am.J.Physiol* 275, C163-C170.
34. Caplan, M. J. (1997). Membrane polarity in epithelial cells: protein sorting and establishment of polarized domains. *Am.J.Physiol.* 272, F425-9.
35. Casanova, J. E., Apodaca, G., Mostov, K. E. (1991). An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66, 65-75.
36. Casanova, J. E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S. G., Navarre, J., Woodrum, J. E., Altschuler, Y., Ray, G. S., Goldenring, J. R. (1999). Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the Cell* 10, 47-61.
37. Castelletti, D., Fracasso, G., Alfalah, M., Cingarlini, S., Colombatti, M., Naim, H. Y. (2006). Apical transport and folding of prostate-specific membrane antigen occurs independent of glycan processing. *J.Biol.Chem.* 281, 3505-3512.
38. Chabrilat, M. L., Wilhelm, C., Wasmeier, C., Sviderskaya, E. V., Louvard, D., Coudrier, E. (2005). Rab8 regulates the actin-based movement of melanosomes. *Molecular Biology of the Cell* 16, 1640-1650.
39. Chavrier, P., Gorvel, J. P., Bertoglio, J. (1993). An immunologist's look at the Rho and Rab GTP-binding proteins. *Immunol.Today* 14, 440-444.
40. Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., Zerial, M. (1991). Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* 353, 769-772.
41. Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K., Zerial, M. (1990). Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol.Cell Biol.* 10, 6578-6585.
42. Chen, W., Feng, Y., Chen, D., Wandinger-Ness, A. (1998). Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Molecular Biology of the Cell* 9, 3241-3257.
43. Chen, X., Kojima, S., Borisy, G. G., Green, K. J. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J.Cell Biol.* 163, 547-557.
44. Chen, Y. T., Holcomb, C., Moore, H. P. (1993). Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 6508-6512.
45. Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621-625.
46. Chuang, J. Z. und Sung, C. H. (1998). The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* 142, 1245-1256.
47. Cleves, A. E. und Kelly, R. B. (1996). Rehearsing the ABCs. Protein translocation. *Curr.Biol.* 6, 276-278.

48. Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci.STKE*. 2004, RE13.
49. Colombo, V., Lorenz-Meyer, H., Semenza, G. (1973). Small intestinal phlorizin hydrolase: the "beta-glycosidase complex". *Biochim.Biophys.Acta* 327, 412-424.
50. Corsi, A. K. und Schekman, R. (1996). Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 271, 30299-30302.
51. Cote, G. P., Luo, X., Murphy, M. B., Egelhoff, T. T. (1997). Mapping of the novel protein kinase catalytic domain of Dictyostelium myosin II heavy chain kinase A. *J.Biol.Chem.* 272, 6846-6849.
52. Cox, D., Lee, D. J., Dale, B. M., Calafat, J., Greenberg, S. (2000). A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 680-685.
53. Danielsen, E. M. und van Deurs, B. (1997). Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Molecular Biology of the Cell* 8, 2241-2251.
54. Darmoul, D., Fox, M., Harvey, C., Jeggo, P., Gum, J. R., Kim, Y. S., Swallow, D. M. (1994). Regional localization of DPP4 (alias CD26 and ADCP2) to chromosome 2q24. *Somat.Cell Mol.Genet.* 20, 345-351.
55. Day, G. J., Mosteller, R. D., Broek, D. (1998). Distinct subclasses of small GTPases interact with guanine nucleotide exchange factors in a similar manner. *Mol.Cell Biol.* 18, 7444-7454.
56. de Graaf, P., Zwart, W. T., van Dijken, R. A., Deneka, M., Schulz, T. K., Geijsen, N., Coffey, P. J., Gadella, B. M., Verkleij, A. J., van der, S. P., van Bergen en Henegouwen PM (2004). Phosphatidylinositol 4-kinasebeta is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex. *Molecular Biology of the Cell* 15, 2038-2047.
57. de Leeuw, H. P., Koster, P. M., Calafat, J., Janssen, H., van Zonneveld, A. J., van Mourik, J. A., Voorberg, J. (1998). Small GTP-binding proteins in human endothelial cells. *Br.J.Haematol.* 103, 15-19.
58. De Renzis, S., Sonnichsen, B., Zerial, M. (2002). Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat.Cell Biol.* 4, 124-133.
59. de Wit, H., Lichtenstein, Y., Kelly, R. B., Geuze, H. J., Klumperman, J., van der, S. P. (2001). Rab4 regulates formation of synaptic-like microvesicles from early endosomes in PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell* 12, 3703-3715.
60. Delacour, D., Cramm-Behrens, C. I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H. Y., Jacob, R. (2006). Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr.Biol.* 16, 408-414.
61. Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J. P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., Andre, S., Le Bivic, A., Gabius, H. J., Manninen, A., Simons, K., Huet, G. (2005). Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J.Cell Biol.* 169, 491-501.
62. Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A., Jacob, R. (2007). Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering. *Traffic.* 8, 379-388.
63. Delacour, D. und Jacob, R. (2006). Apical protein transport. *Cell Mol.Life Sci.* 63, 2491-2505.

64. Deretic, D., Huber, L. A., Ransom, N., Mancini, M., Simons, K., Papermaster, D. S. (1995). rab8 in retinal photoreceptors may participate in rhodopsin transport and in rod outer segment disk morphogenesis. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 1), 215-224.
65. Diaz, E., Schimmoller, F., Pfeffer, S. R. (1997). A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J.Cell Biol.* 138, 283-290.
66. Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T., Pfeffer, S. R. (1997). Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* 16, 465-472.
67. Dorovkov, M. V. und Ryazanov, A. G. (2004). Phosphorylation of Annexin I by TRPM7 Channel-Kinase. *J.Biol.Chem.* 279, 50643-50646.
68. Drennan, D. und Ryazanov, A. G. (2004). Alpha-kinases: analysis of the family and comparison with conventional protein kinases. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 85, 1-32.
69. Durrbach, A., Raposo, G., Tenza, D., Louvard, D., Coudrier, E. (2000). Truncated brush border myosin I affects membrane traffic in polarized epithelial cells. *Traffic.* 1, 411-424.
70. Egelhoff, T. T., Lee, R. J., Spudich, J. A. (1993). Dictyostelium myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization in vivo. *Cell* 75, 363-371.
71. Ellgaard, L. und Helenius, A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13, 431-437.
72. Englund, P. T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu.Rev.Biochem.* 62, 121-138.
73. Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J.Cell Biol.* 131, 1435-1452.
74. Fiedler, K., Kobayashi, T., Kurzchalia, T. V., Simons, K. (1993). Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 32, 6365-6373.
75. Fiedler, K., Parton, R. G., Kellner, R., Etzold, T., Simons, K. (1994). VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells. *EMBO J.* 13, 1729-1740.
76. Fiedler, K. und Simons, K. (1995). The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81, 309-312.
77. Fischer, v. M., Stahl, B., Li, C., Sudhof, T. C., Jahn, R. (1994). Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem.Sci.* 19, 164-168.
78. Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S., Mellman, I. (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99, 189-198.
79. Freyssinet, J. M. (2003). Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J.Thromb.Haemost.* 1, 1655-1662.
80. Fullekrug, J., Scheiffele, P., Simons, K. (1999). VIP36 localisation to the early secretory pathway. *J.Cell Sci.* 112, 2813-2821.
81. Futey, L. M., Medley, Q. G., Cote, G. P., Egelhoff, T. T. (1995). Structural analysis of myosin heavy chain kinase A from Dictyostelium. Evidence for a highly divergent protein

- kinase domain, an amino-terminal coiled-coil domain, and a domain homologous to the beta-subunit of heterotrimeric G proteins. *J.Biol.Chem.* 270, 523-529.
82. Futter, C. E., Gibson, A., Allchin, E. H., Maxwell, S., Ruddock, L. J., Odorizzi, G., Domingo, D., Trowbridge, I. S., Hopkins, C. R. (1998). In polarized MDCK cells basolateral vesicles arise from clathrin-gamma-adaptin-coated domains on endosomal tubules. *J.Cell Biol.* 141, 611-623.
83. Gagescu, R., Demaurex, N., Parton, R. G., Hunziker, W., Huber, L. A., Gruenberg, J. (2000). The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2775-2791.
84. Gallagher, P., Henneberry, J., Wilson, I., Sambrook, J., Gething, M. J. (1988). Addition of carbohydrate side chains at novel sites on influenza virus hemagglutinin can modulate the folding, transport, and activity of the molecule. *J.Cell Biol.* 107, 2059-2073.
85. Gething, M. J. und Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
86. Gilmore, R. (1993). Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* 75, 589-592.
87. Goldenring, J. R., Shen, K. R., Vaughan, H. D., Modlin, I. M. (1993). Identification of a small GTP-binding protein, Rab25, expressed in the gastrointestinal mucosa, kidney, and lung. *J.Biol.Chem.* 268, 18419-18422.
88. Goldenring, J. R., Smith, J., Vaughan, H. D., Cameron, P., Hawkins, W., Navarre, J. (1996). Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues. *Am.J.Physiol* 270, G515-G525.
89. Goldenring, J. R., Soroka, C. J., Shen, K. R., Tang, L. H., Rodriguez, W., Vaughan, H. D., Stoch, S. A., Modlin, I. M. (1994). Enrichment of rab11, a small GTP-binding protein, in gastric parietal cells. *Am.J.Physiol* 267, G187-G194.
90. Gonzalez, L., Jr. und Scheller, R. H. (1999). Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96, 755-758.
91. Goud, B., Salminen, A., Walworth, N. C., Novick, P. J. (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* 53, 753-768.
92. Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., Saraste, J. (1990). Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* 345, 553-556.
93. Grassadonia, A., Tinari, N., Iurisci, I., Piccolo, E., Cumashi, A., Innominato, P., D'Egidio, M., Natoli, C., Piantelli, M., Iacobelli, S. (2004). 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. *Glycoconj.J.* 19, 551-556.
94. Gravotta, D., Deora, A., Perret, E., Oyanadel, C., Soza, A., Schreiner, R., Gonzalez, A., Rodriguez-Boulan, E. (2007). AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104, 1564-1569.
95. Green, E. G., Ramm, E., Riley, N. M., Spiro, D. J., Goldenring, J. R., Wessling-Resnick, M. (1997). Rab11 is associated with transferrin-containing recycling compartments in K562 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 239, 612-616.
96. Green, F., Edwards, Y., Hauri, H. P., Povey, S., Ho, M. W., Pinto, M., Swallow, D. (1987). Isolation of a cDNA probe for a human jejunal brush-border hydrolase, sucrase-isomaltase, and assignment of the gene locus to chromosome 3. *Gene* 57, 101-110.

97. Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I., Kornfeld, S. (1988). The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52, 329-341.
98. Griffiths, G. und Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234, 438-443.
99. Grosshans, B. L., Ortiz, D., Novick, P. (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 11821-11827.
100. Gurkan, C., Lapp, H., Alory, C., Su, A. I., Hogenesch, J. B., Balch, W. E. (2005). Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrome. *Molecular Biology of the Cell* 16, 3847-3864.
101. Hanks, S. K. und Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-596.
102. Hannan, L. A., Lisanti, M. P., Rodriguez-Boulant, E., Edidin, M. (1993). Correctly sorted molecules of a GPI-anchored protein are clustered and immobile when they arrive at the apical surface of MDCK cells. *J.Cell Biol.* 120, 353-358.
103. Hattula, K., Furuholm, J., Tikkanen, J., Tanhuanpää, K., Laakkonen, P., Peranen, J. (2006). Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J.Cell Sci.* 119, 4866-4877.
104. Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P., Gallwitz, D. (1987). The ras-related ypt protein is an ubiquitous eukaryotic protein: isolation and sequence analysis of mouse cDNA clones highly homologous to the yeast YPT1 gene. *EMBO J.* 6, 4049-4053.
105. Hauri, H. P. und Matter, K. (1991). Protein traffic in intestinal epithelial cells. *Semin.Cell Biol.* 2, 355-364.
106. Hauri, H. P., Sterchi, E. E., Bienz, D., Fransen, J. A., Marxer, A. (1985). Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J.Cell Biol.* 101, 838-851.
107. Heine, M., Cramm-Behrens, C. I., Ansari, A., Chu, H. P., Ryazanov, A. G., Naim, H. Y., Jacob, R. (2005). {alpha}-Kinase 1, a New Component in Apical Protein Transport. *J.Biol.Chem.* 280, 25637-25643.
108. Henry, L. und Sheff, D. R. (2008). Rab8 Regulates Basolateral Secretory, but not Recycling, Traffic at the Recycling Endosome. *Molecular Biology of the Cell*.
109. High, S., Lecomte, F. J., Russell, S. J., Abell, B. M., Oliver, J. D. (2000). Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett.* 476, 38-41.
110. Hikita, C., Vijayakumar, S., Takito, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Al Awqati, Q. (2000). Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J.Cell Biol.* 151, 1235-1246.
111. Hirabayashi, J. und Kasai, K. (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3, 297-304.
112. Hirashima, M., Kashio, Y., Nishi, N., Yamauchi, A., Imaizumi, T. A., Kageshita, T., Saita, N., Nakamura, T. (2004). Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconj.J.* 19, 593-600.

113. Honing, S. und Hunziker, W. (1995). Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igpl20 (lamp-1) in MDCK cells. *J.Cell Biol.* 128, 321-332.
114. Hua, W., Sheff, D., Toomre, D., Mellman, I. (2006). Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging. *J.Cell Biol.* 172, 1035-1044.
115. Huang, C. F. und Chuang, N. N. (1998). Molecular cloning of Ras cDNA from *Penaeus japonicus* (Crustacea, decapoda): geranylgeranylation and guanine nucleotide binding. *Gene* 224, 117-122.
116. Huber, L. A., de Hoop, M. J., Dupree, P., Zerial, M., Simons, K., Dotti, C. (1993a). Protein transport to the dendritic plasma membrane of cultured neurons is regulated by rab8p. *J.Cell Biol.* 123, 47-55.
117. Huber, L. A., Dupree, P., Dotti, C. G. (1995). A deficiency of the small GTPase rab8 inhibits membrane traffic in developing neurons. *Mol.Cell Biol.* 15, 918-924.
118. Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R. G., Virta, H., Zerial, M., Simons, K. (1993b). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J.Cell Biol.* 123, 35-45.
119. Hugel, B., Martinez, M. C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J. M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology.(Bethesda.)* 20, 22-27.
120. Hughes, R. C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1473, 172-185.
121. Hughes, R. C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667-676.
122. Hughes, R. C. (2004). Galectins in kidney development. *Glycoconj.J.* 19, 621-629.
123. Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., Mellman, I. (1991). Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66, 907-920.
124. Hunziker, W., Spiess, M., Semenza, G., Lodish, H. F. (1986). The sucrase-isomaltase complex: primary structure, membrane- orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. *Cell* 46, 227-234.
125. Ikonen, E. und Simons, K. (1998). Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin.Cell Dev.Biol.* 9, 503-509.
126. Jacob, R., Alfalah, M., Grunberg, J., Obendorf, M., Naim, H. Y. (2000a). Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J.Biol.Chem.* 275, 6566-6572.
127. Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., Naim, H. Y. (2003). Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr.Biol.* 13, 607-612.
128. Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K. P., Rescher, U., Gerke, V., Naim, H. Y. (2004). Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 279, 3680-3684.
129. Jacob, R. und Naim, H. Y. (2001). Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr.Biol.* 11, 1444-1450.

130. Jacob, R., Radebach, I., Wuthrich, M., Grunberg, J., Sterchi, E. E., Naim, H. Y. (1996). Maturation of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase: generation of the brush border form of the enzyme involves at least two proteolytic cleavage steps. *Eur.J.Biochem.* 236, 789-795.
131. Jacob, R., Weiner, J. R., Stadge, S., Naim, H. Y. (2000b). Additional N-glycosylation and its impact on the folding of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J.Biol.Chem.* 275, 10630-10637.
132. Jacob, R., Zimmer, K. P., Naim, H., Naim, H. Y. (1997). The apical sorting of lactase-phlorizin hydrolase implicates sorting sequences found in the mature domain. *Eur.J.Cell Biol.* 72, 54-60.
133. Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulon, E., Kreitzer, G. (2007). Polarization-dependent selective transport to the apical membrane by KIF5B in MDCK cells. *Dev.Cell* 13, 511-522.
134. Johnson, L. N. und Lewis, R. J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chem.Rev.* 101, 2209-2242.
135. Kaether, C., Skehel, P., Dotti, C. G. (2000). Axonal membrane proteins are transported in distinct carriers: a two-color video microscopy study in cultured hippocampal neurons. *Molecular Biology of the Cell* 11, 1213-1224.
136. Keller, P., Toomre, D., Diaz, E., White, J., Simons, K. (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat.Cell Biol.* 3, 140-149.
137. Kikuchi, A., Yamashita, T., Kawata, M., Yamamoto, K., Ikeda, K., Tanimoto, T., Takai, Y. (1988). Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 24,000 from bovine brain membranes. *J.Biol.Chem.* 263, 2897-2904.
138. Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., Rodriguez-Boulon, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat.Cell Biol.* 2000.Feb;2(2):125-7. 2, 125-127.
139. Kreitzer, G., Schmoranz, J., Low, S. H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., Simon, S. M., Rodriguez-Boulon, E. (2003). Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat.Cell Biol.* 5, 126-136.
140. Kruse, T. A., Bolund, L., Grzeschik, K. H., Ropers, H. H., Sjostrom, H., Noren, O., Mantei, N., Semenza, G. (1988). The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. *FEBS Lett.* 240, 123-126.
141. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
142. Lapierre, L. A., Dorn, M. C., Zimmerman, C. F., Navarre, J., Burnette, J. O., Goldenring, J. R. (2003). Rab11b resides in a vesicular compartment distinct from Rab11a in parietal cells and other epithelial cells. *Exp.Cell Res.* 290, 322-331.
143. Lapierre, L. A., Kumar, R., Hales, C. M., Navarre, J., Bhartur, S. G., Burnette, J. O., Provance, D. W., Jr., Mercer, J. A., Bahler, M., Goldenring, J. R. (2001). Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Molecular Biology of the Cell* 12, 1843-1857.
144. Lau, A. S. und Mruk, D. D. (2003). Rab8B GTPase and junction dynamics in the testis. *Endocrinology* 144, 1549-1563.

145. Le Gall, A. H., Yeaman, C., Muesch, A., Rodriguez-Boulán, E. (1995). Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin.Nephrol.* 15, 272-284.
146. Leese, H. J. und Semenza, G. (1973). On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase. *J.Biol.Chem.* 248, 8170-8173.
147. Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., Poirier, F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj.J.* 19, 433-440.
148. Leitinger, B., Hille-Rehfeld, A., Spiess, M. (1995). Biosynthetic transport of the asialoglycoprotein receptor H1 to the cell surface occurs via endosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 10109-10113.
149. Letourneur, O., Sechi, S., Willette-Brown, J., Robertson, M. W., Kinet, J. P. (1995). Glycosylation of human truncated Fc epsilon RI alpha chain is necessary for efficient folding in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 270, 8249-8256.
150. Lin, S., Naim, H. Y., Rodriguez, A. C., Roth, M. G. (1998). Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J.Cell Biol.* 142, 51-57.
151. Lisanti, M. P., Caras, I. W., Davitz, M. A., Rodriguez-Boulán, E. (1989). A glycosphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J.Cell Biol.* 109, 2145-2156.
152. Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. R., Rodriguez-Boulán, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol- anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85, 9557-9561.
153. Lock, J. G. und Stow, J. L. (2005). Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Molecular Biology of the Cell* 16, 1744-1755.
154. Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002a). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem.Sci.* 27, 514-520.
155. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002b). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
156. Mantei, N., Villa, M., Enzler, T., Wacker, H., Boll, W., James, P., Hunziker, W., Semenza, G. (1988). Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J.* 7, 2705-2713.
157. Martin-Belmonte, F., Puertollano, R., Millan, J., Alonso, M. A. (2000). The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial madin-darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines [In Process Citation]. *Mol.Biol.Cell* 2000.Jun;11(6):2033-45. 11, 2033-2045.
158. Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E. G., Salamero, J., Goud, B. (1997). GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 1828-1833.
159. Martinez, O. und Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1404, 101-112.
160. Martinez-Maza, R., Poyatos, I., Lopez-Corcuera, B., unez, N., Gimenez, C., Zafra, F., Aragon, C. (2001). The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J.Biol.Chem.* 276, 2168-2173.

161. Martoglio, B. und Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* 8, 410-415.
162. Massey-Harroche, D. (2000). Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microsc.Res.Tech.* 49, 353-362.
163. Matlack, K. E., Mothes, W., Rapoport, T. A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92, 381-390.
164. Matter, K., Hunziker, W., Mellman, I. (1992). Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 71, 741-753.
165. Matter, K. und Mellman, I. (1994). Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6, 545-554.
166. Mayer, T., Touchot, N., Elazar, Z. (1996). Transport between cis and medial Golgi cisternae requires the function of the Ras-related protein Rab6. *J.Biol.Chem.* 271, 16097-16103.
167. Mobius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H. F., Slot, J. W., Geuze, H. J. (2003). Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic.* 4, 222-231.
168. Mohrmann, K., Gerez, L., Oorschot, V., Klumperman, J., van der, S. P. (2002a). Rab4 function in membrane recycling from early endosomes depends on a membrane to cytoplasm cycle. *J.Biol.Chem.* 277, 32029-32035.
169. Mohrmann, K., Leijendekker, R., Gerez, L., van der, S. P. (2002b). rab4 regulates transport to the apical plasma membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* 277, 10474-10481.
170. Mohrmann, K. und van der Sluijs, P. (1999). Regulation of membrane transport through the endocytic pathway by rabGTPases. *Mol.Membr.Biol.* 16, 81-87.
171. Monlauzeur, L., Rajasekaran, A., Chao, M., Rodriguez-Boulan, E., Le Bivic, A. (1995). A cytoplasmic tyrosine is essential for the basolateral localization of mutants of the human nerve growth factor receptor in Madin-Darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* 270, 12219-12225.
172. Moore, I., Schell, J., Palme, K. (1995). Subclass-specific sequence motifs identified in Rab GTPases. *Trends Biochem.Sci.* 20, 10-12.
173. Mostov, K. E., Verges, M., Altschuler, Y. (2000). Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12, 483-490.
174. Naim, H. Y. (1992). Processing of human pro-lactase-phlorizin hydrolase at reduced temperatures: cleavage is preceded by complex glycosylation. *Biochem.J.* 285, 13-16.
175. Naim, H. Y., Joberty, G., Alfalah, M., Jacob, R. (1999). Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. *J.Biol.Chem.* 274, 17961-17967.
176. Naim, H. Y., Lacey, S. W., Sambrook, J. F., Gething, M. J. (1991). Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase- phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein. *J.Biol.Chem.* 266, 12313-12320.

177. Naim, H. Y. und Lentze, M. J. (1992). Impact of O-glycosylation on the function of human intestinal lactase- phlorizin hydrolase. Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of O-glycoside addition. *J.Biol.Chem.* 267, 25494-25504.
178. Naim, H. Y. und Naim, H. (1996). Dimerization of lactase-phlorizin hydrolase occurs in the endoplasmic reticulum, involves the putative membrane spanning domain and is required for an efficient transport of the enzyme to the cell surface. *Eur.J.Cell Biol.* 70, 198-208.
179. Naim, H. Y., Sterchi, E. E., Lentze, M. J. (1987). Biosynthesis and maturation of lactase-phlorizin hydrolase in the human small intestinal epithelial cells. *Biochem.J.* 241, 427-434.
180. Naim, H. Y., Sterchi, E. E., Lentze, M. J. (1988). Biosynthesis of the human sucrase-isomaltase complex. Differential O- glycosylation of the sucrase subunit correlates with its position within the enzyme complex. *J.Biol.Chem.* 263, 7242-7253.
181. Nickel, W. (2005). Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.* 6, 607-614.
182. Novick, P. und Brennwald, P. (1993). Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75, 597-601.
183. Novick, P. und Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 496-504.
184. Nuoffer, C., Davidson, H. W., Matteson, J., Meinkoth, J., Balch, W. E. (1994). A GDP-bound of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J.Cell Biol.* 125, 225-237.
185. Ohmori, T., Takeyama, Y., Ueda, T., Hiroyoshi, M., Nakanishi, H., Ohyanagi, H., Saitoh, Y., Takai, Y. (1990). Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a Mr value of 24,000 from rat liver. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 169, 816-823.
186. Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269, 1872-1875.
187. Olkkonen, V. M. und Stenmark, H. (1997). Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int.Rev.Cytol.* 176, 1-85.
188. Orzech, E., Cohen, S., Weiss, A., Aroeti, B. (2000). Interactions between the exocytic and endocytic pathways in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* 275, 15207-15219.
189. Overmeyer, J. H., Wilson, A. L., Erdman, R. A., Maltese, W. A. (1998). The putative "switch 2" domain of the Ras-related GTPase, Rab1B, plays an essential role in the interaction with Rab escort protein. *Molecular Biology of the Cell* 9, 223-235.
190. Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358.
191. Paladino, S., Pocard, T., Catino, M. A., Zurzolo, C. (2006). GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* 172, 1023-1034.
192. Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., Zurzolo, C. (2004). Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J.Cell Biol.* 167, 699-709.

193. Paladino, S., Sarnataro, D., Tivodar, S., Zurzolo, C. (2007). Oligomerization is a specific requirement for apical sorting of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins but not for non-raft-associated apical proteins. *Traffic*. 8, 251-258.
194. Pang, S., Urquhart, P., Hooper, N. M. (2004). N-glycans, not the GPI anchor, mediate the apical targeting of a naturally glycosylated, GPI-anchored protein in polarised epithelial cells. *J.Cell Sci.* 117, 5079-5086.
195. Panzer, P., Preuss, U., Joberty, G., Naim, H. Y. (1998). Protein domains implicated in intracellular transport and sorting of lactase-phlorizin hydrolase. *J.Biol.Chem.* 273, 13861-13869.
196. Patnaik, S. K., Potvin, B., Carlsson, S., Sturm, D., Leffler, H., Stanley, P. (2006). Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 16, 305-317.
197. Peden, A. A., Schonteich, E., Chun, J., Junutula, J. R., Scheller, R. H., Prekeris, R. (2004). The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting. *Molecular Biology of the Cell* 15, 3530-3541.
198. Peranen, J., Auvinen, P., Virta, H., Wepf, R., Simons, K. (1996). Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J.Cell Biol.* 135, 153-167.
199. Pereira-Leal, J. B. und Seabra, M. C. (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J.Mol.Biol.* 301, 1077-1087.
200. Pereira-Leal, J. B. und Seabra, M. C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J.Mol.Biol.* 313, 889-901.
201. Pfeffer, S. und Aivazian, D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5, 886-896.
202. Pfeffer, S. R. (1994). Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6, 522-526.
203. Pfeffer, S. R. (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat.Cell Biol.* 1, E17-E22.
204. Pinna, L. A. und Ruzzene, M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim.Biophys.Acta* 1314, 191-225.
205. Polishchuk, R., Di Pentima, A., Lippincott-Schwartz, J. (2004). Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat.Cell Biol.* 6, 297-307.
206. Powell, R. R. und Temesvari, L. A. (2004). Involvement of a Rab8-like protein of Dictyostelium discoideum, Sas1, in the formation of membrane extensions, secretion and adhesion during development. *Microbiology* 150, 2513-2525.
207. Prekeris, R., Klumperman, J., Scheller, R. H. (2000). A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes. *Mol.Cell* 6, 1437-1448.
208. Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J., Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81-85.

209. Puertollano, R., Martin-Belmonte, F., Millan, J., de Marco, M. C., Albar, J. P., Kremer, L., Alonso, M. A. (1999). The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin- Darby canine kidney cells. *J.Cell Biol.* 145, 141-151.
210. Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E., Kirchhausen, T. (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* 17, 2148-2155.
211. Ren, M., Zeng, J., Lemos-Chiarandini, C., Rosenfeld, M., Adesnik, M., Sabatini, D. D. (1996). In its active form, the GTP-binding protein rab8 interacts with a stress-activated protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 5151-5155.
212. Rodriguez-Boulan, E., Kreitze, G., Musch, A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6, 233-247.
213. Rodriguez-Boulan, E. und Nelson, W. J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725.
214. Rodriguez-Boulan, E., Paskiet, K. T., Salas, P. J., Bard, E. (1984). Intracellular transport of influenza virus hemagglutinin to the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J.Cell Biol.* 98, 308-319.
215. Rodriguez-Boulan, E. und Powell, S. K. (1992). Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu.Rev.Cell Biol.* 8, 395-427.
216. Rothman, J. E. und Wieland, F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227-234.
217. Ryazanov, A. G., Pavur, K. S., Dorovkov, M. V. (1999). Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. *Curr.Biol.* 9, R43-R45.
218. Ryazanov, A. G., Ward, M. D., Mendola, C. E., Pavur, K. S., Dorovkov, M. V., Wiedmann, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parmer, T. G., Prostko, C. R., Germino, F. J., Hait, W. N. (1997). Identification of a new class of protein kinases represented by eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 4884-4889.
219. Ryazanova, L. V., Pavur, K. S., Petrov, A. N., Dorovkov, M. V., Ryazanov, A. G. (2001). Novel type of signaling molecules: Protein kinases covalently linked with ion channels. *Molecular Biology* 35, 271-283.
220. Salminen, A. und Novick, P. J. (1987). A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* 49, 527-538.
221. Sato, S. und Nieminen, J. (2004). Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj.J.* 19, 583-591.
222. Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R., Harada, A. (2007). The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* 448, 366-369.
223. Scheiffele, P., Peranen, J., Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378, 96-98.
224. Schimmoller, F., Simon, I., Pfeffer, S. R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J.Biol.Chem.* 273, 22161-22164.

- 225. Schlegel-Haueter, S., Hore, P., Kerry, K. R., Semenza, G. (1972). The preparation of lactase and glucoamylase of rat small intestine. *Biochim.Biophys.Acta* 258, 506-519.
- 226. Schluter, O. M., Schmitz, F., Jahn, R., Rosenmund, C., Sudhof, T. C. (2004). A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J.Neurosci.* 24, 6629-6637.
- 227. Schmitt, H. D., Wagner, P., Pfaff, E., Gallwitz, D. (1986). The ras-related YPT1 gene product in yeast: a GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell* 47, 401-412.
- 228. Schroeder, R. J., Ahmed, S. N., Zhu, Y., London, E., Brown, D. A. (1998). Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J.Biol.Chem.* 273, 1150-1157.
- 229. Schuck, S., Gerl, M. J., Ang, A., Manninen, A., Keller, P., Mellman, I., Simons, K. (2007). Rab10 is involved in basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic*. 8, 47-60.
- 230. Schuck, S. und Simons, K. (2004). Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J.Cell Sci.* 117, 5955-5964.
- 231. Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., Wandinger-Ness, A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J.Cell Sci.* 120, 3905-3910.
- 232. Segev, N. (2001). Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci.STKE.* 2001, RE11.
- 233. Semenza, G. (1979). Mode of insertion of the sucrase-isomaltase complex in the intestinal brush border membrane: implications for the biosynthesis of this stalked intrinsic membrane protein. *Ciba Found.Symp.* 133-146.
- 234. Semenza, G., Brunner, J., Wacker, H. (1983). Biosynthesis and assembly of the largest and major intrinsic polypeptide of the small intestinal brush borders. *Ciba Found.Symp.* 95, 92-112.
- 235. Sheff, D., Pelletier, L., O'Connell, C. B., Warren, G., Mellman, I. (2002). Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J.Cell Biol.* 156, 797-804.
- 236. Simmen, T., Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R., Hunziker, W. (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat.Cell Biol.* 4, 154-159.
- 237. Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- 238. Skibbens, J. E., Roth, M. G., Matlin, K. S. (1989). Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J.Cell Biol.* 108, 821-832.
- 239. Skovbjerg, H., Sjoström, H., Noren, O. (1981). Purification and characterisation of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine. *Eur.J.Biochem.* 114, 653-661.
- 240. Soldati, T., Rancano, C., Geissler, H., Pfeffer, S. R. (1995). Rab7 and Rab9 are recruited onto late endosomes by biochemically distinguishable processes. *J.Biol.Chem.* 270, 25541-25548.

241. Soldati, T., Shapiro, A. D., Svejstrup, A. B., Pfeffer, S. R. (1994). Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* 369, 76-78.
242. Somsel, R. J. und Wandinger-Ness, A. (2000). Rab GTPases coordinate endocytosis. *J.Cell Sci.* 113 Pt 2, 183-192.
243. Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J.Cell Biol.* 149, 901-914.
244. Stein, M. P., Dong, J., Wandinger-Ness, A. (2003). Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 55, 1421-1437.
245. Stenmark, H. und Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3007.
246. Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., Zerial, M. (1994a). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13, 1287-1296.
247. Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, O., Ullrich, O., Goud, B., Zerial, M. (1994b). Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *EMBO J.* 13, 575-583.
248. Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G. M. (2004). Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science* 305, 55-59.
249. Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J., Raposo, G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* 3, 321-330.
250. Swanljung-Collins, H. und Collins, J. H. (1992). Phosphorylation of brush border myosin I by protein kinase C is regulated by Ca(2+)-stimulated binding of myosin I to phosphatidylserine concerted with calmodulin dissociation. *J.Biol.Chem.* 267, 3445-3454.
251. Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81, 153-208.
252. Takai, Y., Sasaki, T., Shirataki, H., Nakanishi, H. (1996). Rab3A small GTP-binding protein in Ca(2+)-dependent exocytosis. *Genes Cells* 1, 615-632.
253. Tall, R. D., Alonso, M. A., Roth, M. G. (2003). Features of influenza HA required for apical sorting differ from those required for association with DRMs or MAL. *Traffic.* 4, 838-849.
254. Taylor, S. S., Knighton, D. R., Zheng, J., Ten Eyck, L. F., Sowadski, J. M. (1992). Structural framework for the protein kinase family. *Annu.Rev.Cell Biol.* 8, 429-462.
255. Thomas, D. C., Brewer, C. B., Roth, M. G. (1993). Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J.Biol.Chem.* 268, 3313-3320.
256. Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi-Far, R., Der, C. J., Balch, W. E. (1992). GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J.Cell Biol.* 119, 749-761.
257. Tomasetto, C., Rio, M. C., Gautier, C., Wolf, C., Hareuveni, M., Chambon, P., Lathe, R. (1990). hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma. *EMBO J.* 9, 407-414.

258. Toomre, D., Keller, P., White, J., Olivo, J. C., Simons, K. (1999). Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J.Cell Sci.* **112**, 21-33.
259. Touchot, N., Chardin, P., Tavitian, A. (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 8210-8214.
260. Trischler, M., Stoorvogel, W., Ullrich, O. (1999). Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J.Cell Sci.* **112** (Pt 24), 4773-4783.
261. Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., Parton, R. G. (1996). Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J.Cell Biol.* **135**, 913-924.
262. Urbe, S., Huber, L. A., Zerial, M., Tooze, S. A., Parton, R. G. (1993). Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett.* **334**, 175-182.
263. Van Den, B. F., Califice, S., Castronovo, V. (2004). Expression of galectins in cancer: a critical review. *Glycoconj.J.* **19**, 537-542.
264. van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-740.
265. van der Sluijs, P., Hull, M., Zahraoui, A., Tavitian, A., Goud, B., Mellman, I. (1991). The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 6313-6317.
266. van der Sluijs, P., Mohrmann, K., Deneka, M., Jongeneelen, M. (2001). Expression and properties of Rab4 and its effector rabaptin-4 in endocytic recycling. *Methods Enzymol.* **329**, 111-119.
267. van Meer, G. und Simons, K. (1986). The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* **5**, 1455-1464.
268. Verges, M., Havel, R. J., Mostov, K. E. (1999). A tubular endosomal fraction from rat liver: biochemical evidence of receptor sorting by default. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 10146-10151.
269. Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey, M., Stenmark, H., Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J.* **17**, 1941-1951.
270. von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic.Acids.Res.* **14**, 4683-4690.
271. Vonderheit, A. und Helenius, A. (2005). Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS.Biol.* **3**, e233.
272. Walworth, N. C., Brennwald, P., Kabcenell, A. K., Garrett, M., Novick, P. (1992). Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **12**, 2017-2028.

- 273. Wandering-Ness, A., Bennett, M. K., Antony, C., Simons, K. (1990). Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J.Cell Biol.* **111**, 987-1000.
- 274. Wang, E., Brown, P. S., Aroeti, B., Chapin, S. J., Mostov, K. E., Dunn, K. W. (2000). Apical and basolateral endocytic pathways of MDCK cells meet in acidic common endosomes distinct from a nearly-neutral apical recycling endosome. *Traffic.* **1**, 480-493.
- 275. Wehrle-Haller, B. und Imhof, B. A. (2001). Stem cell factor presentation to c-Kit. Identification of a basolateral targeting domain. *J.Biol.Chem.* **276**, 12667-12674.
- 276. Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., Salamero, J. (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J.Cell Biol.* **151**, 1207-1220.
- 277. Wilkinson, S., Paterson, H. F., Marshall, C. J. (2005). Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat.Cell Biol.*
- 278. Wuthrich, M., Grunberg, J., Hahn, D., Jacob, R., Radebach, I., Naim, H. Y., Sterchi, E. E. (1996). Proteolytic processing of human lactase-phlorizin hydrolase is a two- step event: identification of the cleavage sites. *Arch.Biochem.Biophys.* **336**, 27-34.
- 279. Yeaman, C., Le Gall, A. H., Baldwin, A. N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., Rodriguez-Boulan, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.* **139**, 929-940.
- 280. Zerial, M. und McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 107-117.
- 281. Zerial, M. und Stenmark, H. (1993). Rab GTPases in vesicular transport. *Curr.Opin.Cell Biol.* **5**, 613-620.
- 282. Zot, H. G., Doberstein, S. K., Pollard, T. D. (1992). Myosin-I moves actin filaments on a phospholipid substrate: implications for membrane targeting. *J.Cell Biol.* **116**, 367-376.
- 283. Zurzolo, C., van't Hof, W., van Meer, G., Rodriguez-Boulan, E. (1994). VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *EMBO J.* **13**, 42-53.

8. Anhang

8.1

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Vol. 280, No. 27, Issue of July 8, pp. 25637–25643, 2005
Printed in U.S.A.

α -Kinase 1, a New Component in Apical Protein Transport*

Received for publication, February 28, 2005, and in revised form, April 14, 2005
Published, JBC Papers in Press, May 9, 2005, DOI 10.1074/jbc.M502265200

Martin Heine[‡], Catharina I. Cramm-Behrens[‡], Athar Ansari[§], Hsueh-Ping Chu[§],
Alexey G. Ryazanov[§], Hassan Y. Naim[¶], and Ralf Jacob^{‡¶}

From the [‡]Department of Cell Biology and Cell Pathology, Philipps-University Marburg, D-35033 Marburg, Germany, the [§]Department of Pharmacology, Robert Wood Johnson Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Piscataway, New Jersey 08854-5635, and the [¶]Department of Physiological Chemistry, School of Veterinary Medicine D-30559 Hannover, Germany

A key aspect in the structure of epithelial cells is the maintenance of a polarized organization based on a highly specific sorting machinery for cargo destined for the apical or the basolateral membrane domain at the exit site of the *trans*-Golgi network. We could recently identify two distinct post-*trans*-Golgi network vesicle populations that travel along separate routes to the plasma membrane, a lipid raft-dependent and a lipid raft-independent pathway. A new component of raft-carrying apical vesicles is α -kinase 1 (ALPK1), which was identified in immunisolated vesicles carrying raft-associated sucrase-isomaltase (SI). This kinase was absent from vesicles carrying raft-non-associated lactase-phlorizin hydrolase. The expression of ALPK1 increases by the time of epithelial cell differentiation, whereas the intracellular localization of ALPK1 on apical transport vesicles was confirmed by confocal analysis. A phosphorylation assay on isolated SI-carrying vesicles revealed the phosphorylation of a protein band of about 105 kDa, which could be identified as the motor protein myosin I. Finally, a specific reduction of ALPK1-expression by RNA interference results in a significant decrease in the apical delivery of SI. Taken together, our data suggest that the phosphorylation of myosin I by ALPK1 is an essential process in the apical trafficking of raft-associated SI.

discrimination of apical determinants from basolateral sorting signals, which are located in the cytosolic domains of *trans*-membrane proteins (2–5). The formation of vesicles targeted to the basolateral membrane is catalyzed by adaptor coat proteins (6, 7), whereas the components required for the formation of apical transport carriers are less well defined. One characteristic feature of a wide variety of apical *trans*-membrane proteins is their association with sphingolipid- and cholesterol-rich lipid rafts, which serve as platforms for apical targeting (8). Raft association in the cell is mediated by glycosylphosphatidylinositol anchoring of polypeptides (9), determinants present in *trans*-membrane domains (10), or carbohydrate chains in close proximity to the membrane (11, 12). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associate in the TGN with lipid rafts, and recent data suggest that these platforms are first delivered to the basolateral membrane followed by transcytosis to the apical cell surface (13). This indirect transport pathway of epithelial cells would be analogous to the apical transport route in hepatocytes (14). In addition, epithelial cells harbor a direct route for the delivery of non-raft-associated apical material (13). These observations corroborate our observations of two separate apical vesicle populations in MDCK cells (15, 16). We monitored the exocytic apical transport pathways in living cells with two hydrolases of the intestinal brush border as model proteins, YFP-tagged sucrase-isomaltase (SI) as raft-associated marker and the non-raft-associated CFP-tagged lactase-phlorizin hydrolase (LPH). SI and LPH leave the TGN in post-Golgi carriers that pinch off two different vesicle populations, LPH-carrying apical vesicles and SI-containing apical vesicles (SAVs), which segregate their cargo along different cytoskeletal tracks to the apical plasma membrane (16).

In this study, we identified the association of the α -kinase ALPK1 as a new component of the raft-containing SAV vesicle population. Here, we demonstrate the association of ALPK1 with exocytic SAV vesicles that have left the Golgi apparatus. Furthermore, ALPK1 plays an essential role in the exocytic transport to the apical plasma membrane in epithelial cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and Reagents—Streptomycin, penicillin, glutamine, Dulbecco's modified Eagle's medium, methionine-free Dulbecco's modified Eagle's medium (denoted Met-free medium), fetal calf serum, and trypsin were purchased from BioWest, Essen, Germany. Pepstatin, leupeptin, aprotinin, trypsin inhibitor, and molecular mass standards for SDS-PAGE were purchased from Sigma. Soybean trypsin inhibitor was obtained from Roche Diagnostics. L-[³⁵S]Methionine (>1000 Ci/mmol) and protein A-Sepharose were obtained from Amersham Biosciences.

Epithelial cell polarity is the result of a domain-specific protein sorting process. On the cellular and molecular level, it is manifested by differences in the protein and lipid content of apical or basolateral membrane domains and a polarized organization of the cytoskeleton (for a review, see Ref. 1). These phenomena are closely connected by a sorting machinery as a central element that is responsible for the specific sorting and a directed transport of protein and lipid components to the apical or basolateral membrane compartment of epithelial cells. This machinery operates at the level of the TGN¹ by the

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, Germany Grants JA 1033/1-2 (to H. Y. N. and R. J.) and Sonderforschungsbereich 593 (to R. J.) and by the National Institute of Health Grants RO1 GM57300 and RO1 CA81102 (to A. G. R.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Cell Biology and Cell Pathology, University of Marburg, Robert-Koch-Str. 6, D-35033 Marburg, Germany. Tel.: 49-6421-286-6482; Fax: 49-6421-286-6414; E-mail: jacob@staff.uni-marburg.de.

¹ The abbreviations used are: TGN, *trans*-Golgi network; SI, sucrase-isomaltase (all forms); SI_R, mannose-rich SI; SI_C, complex glycosylated SI; LPH, lactase-phlorizin hydrolase; SAV, SI-carrying apical vesicle; ALPK1, α -kinase 1; TEMED, *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine; MDCK,

Madin-Darby canine kidney cells; YFP, yellow fluorescent protein; CFP, cyan fluorescent protein; mAb, monoclonal antibody; pAb, polyclonal antibody; GT, galactosyltransferase; TFP, trifluoroperazine; siRNA, small interfering RNA; RT, reverse transcriptase; myo1a, myosin 1a.

Acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide and TEMED were purchased from Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany. SDS, ammonium persulfate, dithiothreitol, and Triton X-100 were obtained from Merck. Restriction enzymes were obtained from MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany, and *Tfu* polymerase was obtained from Qbiogene, Heidelberg, Germany. For RNA interference experiments, specific depletion of ALPK1 was performed with the siRNA duplex corresponding to nucleotides 66–86 (Ambion), whereas nonspecific duplexes of luciferase siRNA (Dharmacon) were used as a control.

Vesicle Preparation and Precipitation—Post-TGN vesicles of MDCK-SI-YFP and MDCK-LPH_{Myc} cells were isolated as described previously (16). In principle, sucrose gradient fractions enriched with post-TGN vesicles were used for immunoprecipitation with monoclonal antibody (mAb) anti-green fluorescent protein (Clontech) or mAb anti-Myc (Sigma). The washed samples were then processed by kinase-assays or SDS-PAGE analysis.

Protein Preparations for Mass Spectrometry—The immunoprecipitates were loaded on SDS-gels followed by colloidal staining with Coomassie Blue, and single bands were cut out and transferred into an Eppendorf tube (17). Trypsin digestion and mass spectrometric analysis of isolated proteins were performed by S. König (Proteomics Group, Integrated Functional Genomics, ICCR, University of Münster, Germany).

Immunochemical Reagents and Immunoblotting—Immunoblotting employed polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Schwalbach, Germany) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, which were visualized by ECL (Amersham Biosciences). The antibodies C38516 and 82855 directed against myosin I, pAb anti-myosin I, was a generous gift from Drs. I. Meza (Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico City, Mexico), I. Baines (Max Planck Institute (MPI), Heidelberg, Germany), and E. Korn (National Institutes of Health). For immunoprecipitation of human SI, a mixture of the mouse mAbs of hybridoma HBB 1/219, HBB 2/619, and HBB 3/705 was used (18), which was a generous gift from Drs. H. P. Hauri (Biocenter, University of Basel, Switzerland) and E. Sterchi (University of Bern, Switzerland). As internal control for Western blot experiments, we used mAb anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Stressgen, Victoria, Canada) or mAb anti-vimentin (Immunotech, Marseille, France). Polyclonal antibodies were raised in rabbit against the full-length ALPK1-MBP fusion protein by Cocalico Inc. (Reamstown, CT). Antibodies were affinity-purified from serum over a column of ALPK1-MBP cross-linked to Affi-Gel-10 (Bio-Rad). Purification of antibody was performed in batches. In each batch, 5 ml of anti-serum was incubated with 2 ml of ALPK1-afigel 10 beads at 25 °C with gentle swirling. Beads with adsorbed antibodies were packed into a small column and washed with phosphate-buffered saline until no protein was detected in the eluate. Elution was performed with 200 mM glycine-HCl, pH 2.6. Immediately after elution, pH of eluate was brought back to 7.0 by adding 100 μ l of 1 M Tris-HCl, pH 8.0, per ml of eluate. Fractions containing antibodies were pooled and dialyzed against 2 liters of phosphate-buffered saline containing 10% glycerol and 0.1% Triton X-100. Purified antibodies were frozen in aliquots and stored at –20 °C.

Construction of cDNA Clones—The cDNA of ALPK1 (19) was amplified using the primer pair 5'-CCGCTCGAGTCATGAATAATCAAAAAGTGTAGC-3'/5'-CGCGGATCCGGTGTGCATGTTTCTCCATTG-3' and ligated into the unique sites BamHI/XhoI of the pECFP-C1 vector (Clontech). The resulting plasmid denoted pALPK1-CFP was confirmed by sequencing.

Kinase Assay—The kinase assay has been performed using immunoprecipitated myosin Ia-YFP and ALPK1-CFP in principal, as described previously (19). The samples were incubated in kinase buffer (50 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 50 μ M ATP, pH 6.6) containing 20 μ Ci of [γ -³²P]ATP at 30 °C for the indicated periods of time followed by SDS-PAGE and phosphorimaging analysis.

Cell Culture, Biosynthetic Labeling, and Immunoprecipitation—Caco-2, COS-1, and MDCK cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum at 37 °C. Plasmid and siRNA transfection was performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Metabolic labeling of Caco-2 cells with [³⁵S]methionine for 4 h and immunoprecipitation with mAb anti-SI was performed essentially as described before (20). For surface precipitation, biosynthetically labeled cells were incubated for 2 h at 4 °C in the presence of mAb anti-SI followed by cell lysis and precipitation of the antigen-antibody complex with protein A-Sepharose by centrifugation. The precipitated aliquots were washed, and mAb anti-SI was added to the remaining supernatants to precipitate the internal mannose-rich and complex glycosylated stores of both enzymes. The immunoprecipitates were subjected to 6% SDS-PAGE, and phosphorimages were analyzed with the Bio-Rad Quantity One software.

RNA Extraction and Real-time PCR—For RNA extraction and cDNA

synthesis RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Fermentas) were used. The quantitative determination of cDNA was performed using a Cepheid Smart Cycler II (Intas, Göttingen, Germany) and the QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen). The primers used for the real-time PCR were 5'-TGTGTCGGAAGAGGACAAGAGCGA-3'/5'-TTTGTACTGCCACTTTTCAGGCACGA-3' for ALPK1 and 5'-TATGTTTGAGACCTTCAACACC-3'/5'-CTCCAGAGTCCATGACAATGC-3' for γ -actin. The annealing temperature for ALPK1 primers was 59.7 °C, and for γ -actin, it was 56.6 °C. RNA proportions of ALPK1 were standardized according to γ -actin values.

Confocal Fluorescence Microscopy—Confocal images of living cells were acquired on a Leica TCS SP2 microscope using a $\times 63$ water planapochromat lens (Leica Microsystems) essentially as described before (15).

RESULTS

Association of ALPK1 with SAVs—The apical post-Golgi transport carriers LPH-carrying apical vesicles and SAVs from MDCK cells contain common and unique components (16). A band of about 140 kDa could be exclusively detected in preparations of immunisolated SAVs (Fig. 1A). Two separate matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry analyses of this band revealed peak lists that corresponded to the trypsinized peptide pattern of lymphocyte α -kinase or α -kinase 1 (ALPK1, according to the new nomenclature of α -kinases), with a molecular mass of 139 kDa (accession number NP_079420). This result was confirmed by immunoblots in which the 140-kDa band was detected exclusively in SAV vesicles using a pAb anti-ALPK1 antibody (Fig. 1B). ALPK1 belongs to a new family of kinases, named α -kinases, with sequence homology to myosin heavy chain kinase from *Dictyostelium* (21–23). It is expressed in various tissues (19) and the polarized epithelial cell lines MDCK and Caco-2 (Fig. 1C). The degree of expression during cell differentiation was analyzed in Caco-2 cells by immunoblotting and quantitative RT-PCR (Fig. 2). Here, we could show that the synthesis of ALPK1 mRNA increased significantly in the first 8 days of cell polarization resulting in quantitative amounts of the polypeptide in fully differentiated epithelial cells.

Confocal Analysis of ALPK1-CFP and SI-YFP—The subcellular localization of ALPK1 was examined in co-transfection experiments in COS-1 cells utilizing chimeras of ALPK1 fused to CFP and the *trans*-Golgi-marker galactosyltransferase-YFP (GT-YFP) (Fig. 3A). Here, ALPK1-CFP showed a vesicular staining in the cytosol and a condensation next to the nucleus that co-localized with GT-YFP fluorescence. In addition, ALPK1-positive vesicular carriers were also labeled by SI-YFP (Fig. 3B), which suggests that both proteins are transported on the same route along the secretory pathway.

Kinase Activity on Isolated SAVs—To gain insight into the role of this kinase on post-Golgi vesicles, we analyzed its activity on immunisolated SAVs. Incubation of these vesicles with [γ -³²P]ATP for different time intervals at 37 °C followed by SDS-PAGE and phosphorimaging analysis revealed the incorporation of ³²P into a major 105-kDa polypeptide and three minor proteins of 50, 25, and 16 kDa (Fig. 4, A and B).

Based on previous observations, which describe the identification of a 105-kDa SAV-associated motor protein of the myosin I subfamily (16, 24), we analyzed the identity of the phosphorylated 105-kDa protein by immunoblotting with pAb anti-myosin I. Here, SAVs were immunisolated after varying times of TGN-release, incubated in the presence of ³²P, subjected to SDS-PAGE, and blotted onto a nitrocellulose membrane. Interestingly, a band of 105 kDa, which was found phosphorylated in the kinase assay (Fig. 4C), could be detected in the immunoblot. This points to a myosin I as one target for phosphorylation on isolated SAVs. Furthermore, in these experiments, the intensities of immunostained myosin I increased by the time

FIG. 1. Vesicle association and expression pattern of ALPK1. For a TGN accumulation of newly synthesized material, MDCK, MDCK-LPH_{myc}, and MDCK-SI-YFP cells were incubated at 20 °C for 6 h followed by TGN release at 37 °C for 1 h (A and B). Cell homogenates were loaded onto a step sucrose gradient, and TGN-38-positive fractions were used for vesicle precipitation with mAb anti-green fluorescent protein (α -GFP) or anti-Myc (α -myc). The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE (A, 10%; B, 6%), stained with Coomassie Brilliant Blue (A), or transferred to a polyvinylidene difluoride membrane and labeled with pAb anti-ALPK1 (B). Protein bands identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry analysis are indicated. C, ALPK1 expression in MDCK and Caco-2 cells was analyzed by Western blot with pAb anti-ALPK1 and RT-PCR. *neg. control*, negative control.

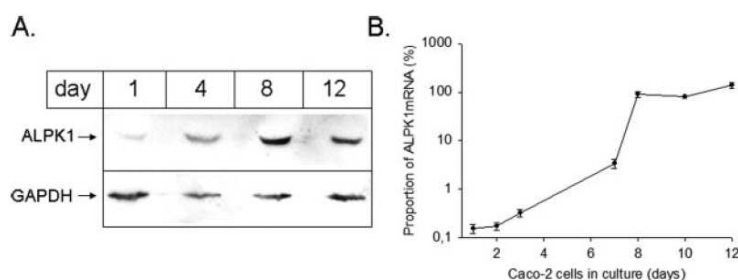
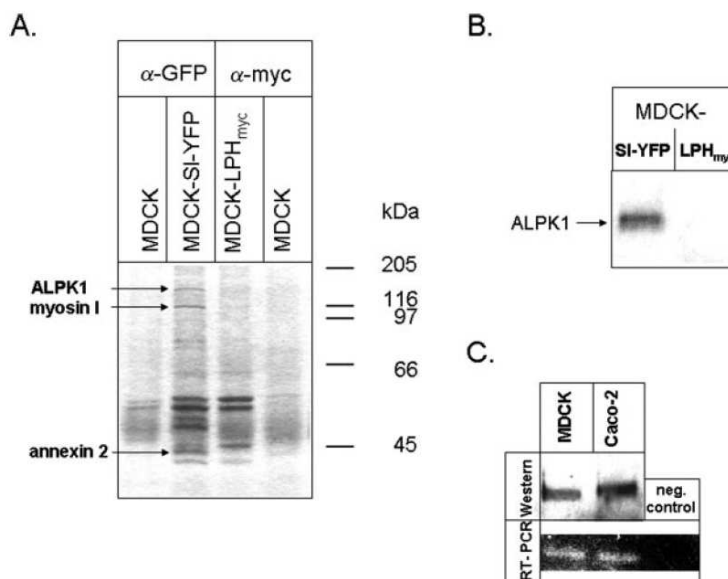
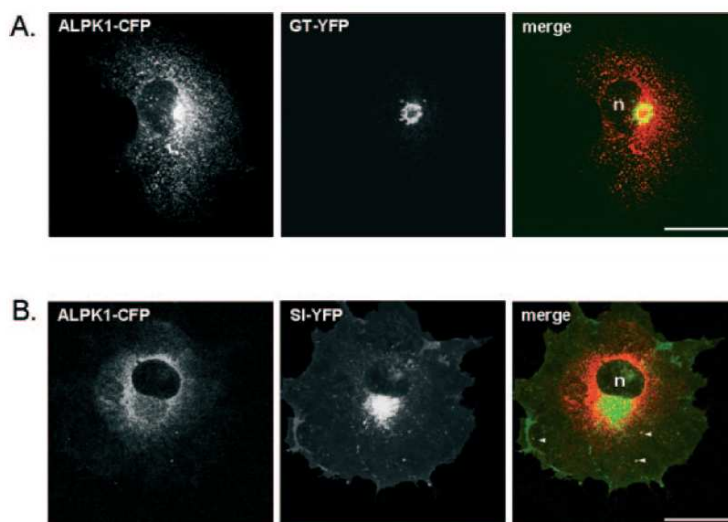


FIG. 2. Increase in the expression of ALPK1 during epithelial differentiation of Caco-2 cells. Caco-2 cells were cultivated for different time intervals, and ALPK1 expression was analyzed by Western blot with pAb anti-ALPK1 and mAb anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (A) or quantitative RT-PCR (B).

FIG. 3. Subcellular distribution of ALPK1. COS-1 cells were co-transfected with ALPK1-CFP and GT-YFP (A) or SI-YFP (B). 1 day after transfection, the cells were incubated for 4 h at 20 °C to accumulate proteins in the Golgi apparatus followed by a TGN release at 37 °C for 20 min. This incubation was performed in the presence of 1.6 mM cycloheximide to inhibit protein synthesis. Arrows indicate transport vesicles stained by ALPK1 and SI (B). Scale bars, 10 μ m. *n*, nucleus.



after TGN release, which indicates that the actin motor protein accumulates on vesicles during their passage to the cell surface. On the other hand, the highest degree of 32 P-incorporation into the myosin band could be observed 20 min after TGN exit. This was reversed by incubation with λ -phosphatase (Fig. 4D). Shorter or longer time intervals resulted in less 32 P incorporation, indicating a time interval of maximum myosin phosphorylation after TGN-release.

The next question was whether ALPK1 is the kinase that can

catalyze the phosphorylation of myosin Ia. When isolated vesicles were incubated with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in the presence or absence of EDTA for calcium depletion, trifluoroperazine (TFP) as calmodulin inhibitor, or the kinase inhibitor staurosporine, only effectors of Ca^{2+} and calmodulin were capable of reducing significantly the amount of myosin Ia phosphorylation (Fig. 4, E and F). Interestingly, insensitivity to staurosporine is a specific property of the ALPK1 homologues eEF-2 kinase and TRPM7/ChaK1 (25, 26). Furthermore, in an *in vitro* approach

25640

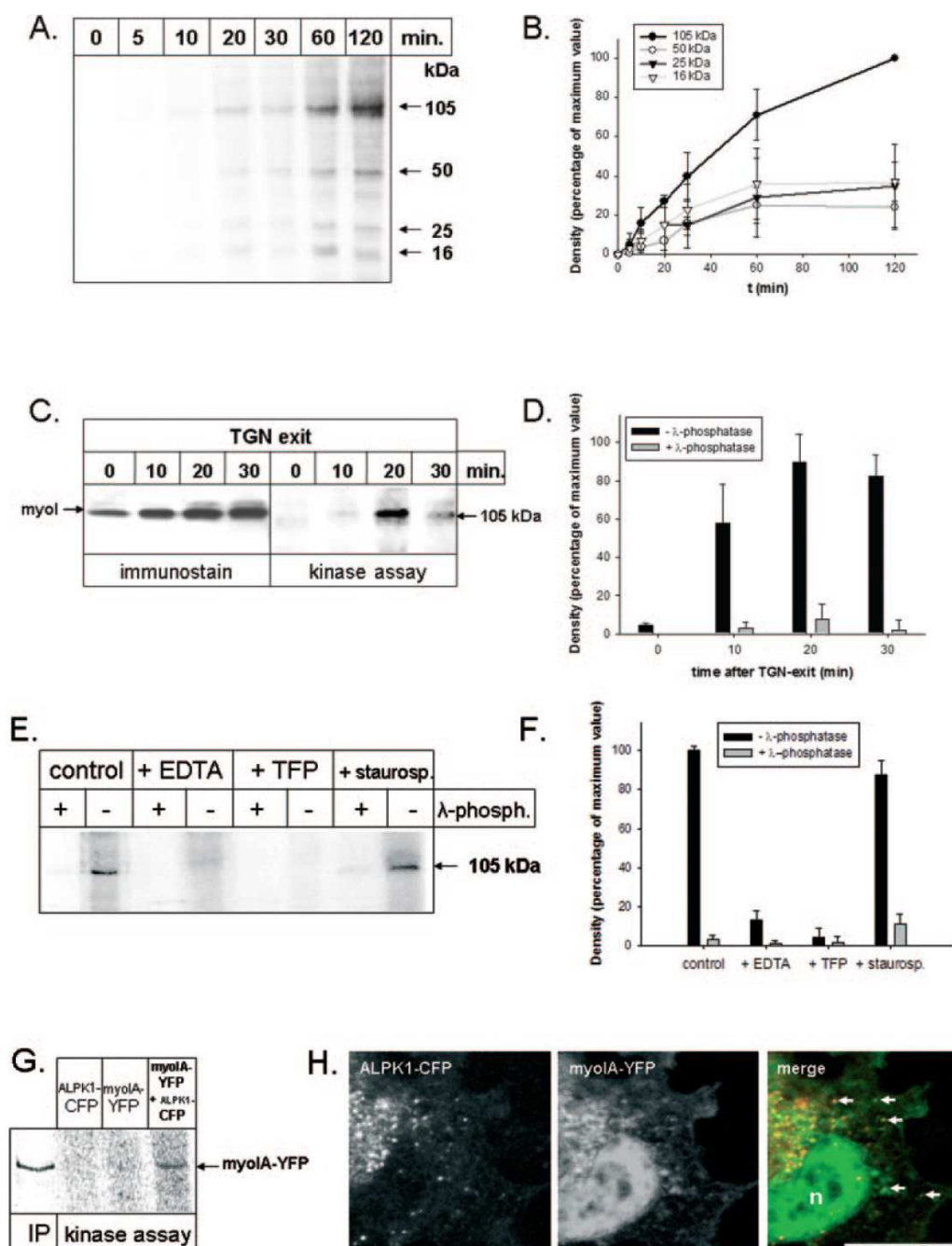
Cell Polarity, Vesicle Transport, α -Kinase, and Myosin


FIG. 4. Phosphorylation of myosin I (myoI) on isolated SAVs. A, SAVs were isolated from MDCK-SI-YFP cells, as indicated in the legend for Fig. 1, and incubated in the presence of [γ - 32 P]ATP for different time periods at 37 $^{\circ}$ C. The samples were subjected to SDS-PAGE followed by phosphorimaging analysis. B, the proportions of 32 P-labeled polypeptides were quantified. C, SAVs were isolated from MDCK-SI-YFP cells after different intervals of TGN release and incubated in the presence of [γ - 32 P]ATP. The samples were subjected to SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose. Vesicle-associated myosin I was labeled with pAb anti-myosin I (left). Thereafter, 32 P labeling on the blot was analyzed by phosphorimaging (right). Here, a protein band with exactly the same molecular weight as myosin I could be detected. D, the proportion of 32 P labeling of the 105-kDa polypeptide in the presence or absence of λ -phosphatase was quantified. E, 32 P labeling of a 105-kDa polypeptide on isolated SAVs in the presence or absence of EDTA, TFP, or staurosporine (+ staurosp.). λ -phosph., λ -phosphatase. F, quantification of the proportions indicated in E. G, phosphorylation of recombinant myo1A-YFP in the presence or absence of ALPK1-CFP. Biosynthetically labeled immunoprecipitated myo1A-YFP is indicated as control (IP). H, confocal analysis of COS-1 cells co-transfected with ALPK1-CFP and myo1A-YFP 20 min after TGN-release. Arrows indicate transport vesicles stained by ALPK1-CFP and myo1A-YFP. The data of three independent experiments were used for quantification. Scale bars, 10 μ m. n, nucleus.

with immunoprecipitated ALPK1-CFP and myo1A-YFP (24), we directly analyzed whether ALPK1 is able to catalyze the phosphorylation of this motor protein by incubating the two components separately or together with [γ - 32 P]ATP at 37 $^{\circ}$ C

for 30 min. Fig. 4G depicts that the fusion proteins were not phosphorylated when added separately, whereas a faint 32 P incorporation into myo1A-YFP was detected in the samples containing ALPK1 and myosin Ia, which indicates that my-

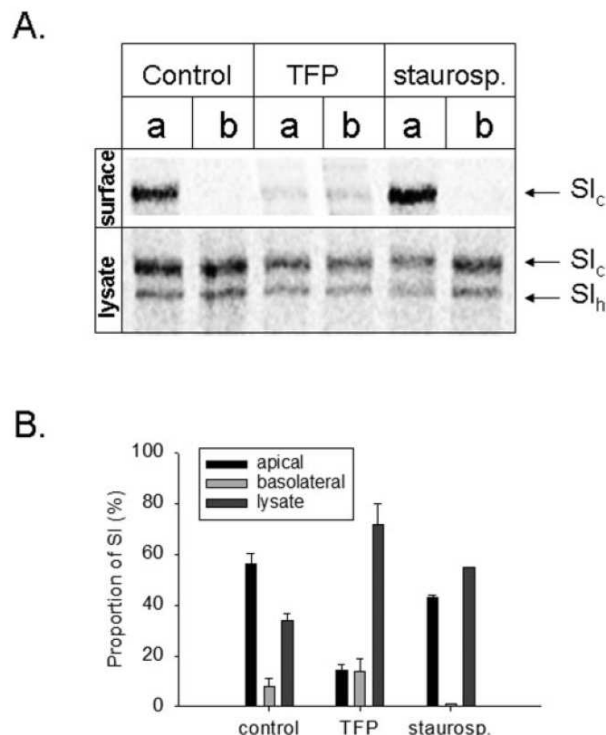


FIG. 5. Impact of ALPK1-inhibitor on apical transport of SI. A, Caco-2 cells were biosynthetically labeled in the presence or absence of TFP or staurosporine (*staurosp.*) for 4 h with [³⁵S]methionine followed by cell surface precipitation of SI from the apical (a) or basolateral (b) cell surface. SI_h and SI_c were isolated from the remaining lysates, separated by SDS-PAGE, and analyzed on a phosphorimaging device. B, the proportions of SI_h and SI_c from three independent experiments were quantified.

osin Ia may be a molecular target for the kinase activity of ALPK1 on post-TGN apical transport vesicles. To further analyze whether ALPK1 and myosin Ia are found in the same subcellular compartments, COS-1 cells transfected with ALPK1-CFP and myo1A-YFP were analyzed by confocal microscopy. 1 day after transfection, the newly synthesized proteins were chased into the TGN at 20 °C followed by a temperature shift to 37 °C to enable their release from this organelle. A direct overlap between ALPK1-labeled vesicular structures and myo1A-YFP staining is shown in Fig. 4H, strongly suggesting that myosin Ia binds to ALPK1-carrying post-TGN vesicles.

Effect of ALPK1 Inhibition and Knockdown—For the analysis of an *in vivo* role of ALPK1 in apical protein transport, we analyzed the transport and sorting of sucrose-isomaltase in Caco-2 cells biosynthetically labeled in the presence or absence of TFP or staurosporine. Cell surface immunoprecipitation of SI revealed the complex glycosylated SI_c form exclusively at the apical membrane, whereas the cellular lysates contained the mannose-rich SI_h form as well as SI_c (Fig. 5A). The targeting of SI_c to the apical membrane is sensitive to calmodulin inhibition by TFP, whereas staurosporine on the other hand did not have an effect on apical transport of SI (Fig. 5, A and B), suggesting that apical transport depends on a non-conventional, Ca²⁺/calmodulin-sensitive kinase.

In a second approach, intracellular ALPK1 was reduced in Caco-2 cells by RNA-mediated interference to specifically deplete intracellular ALPK1. A significant reduction of ALPK1 mRNA as well as protein levels by about 80% in the RNA

interference-treated samples is depicted in Fig. 6, A and B. We then analyzed the apical or basolateral delivery of SI in ALPK1-depleted polarized Caco-2 cells. As a result of the reduction of intracellular ALPK1 levels, the proportion of SI that has been delivered to the apical domain was substantially decreased, although a remarkable amount of SI still reached the apical cell surface (Fig. 6C). This might be due to the presence of about 20% of ALPK1 remaining after siRNA treatment. However, the ALPK1-dependent reduction in apical surface delivery of SI suggests that this α -kinase is involved in the transport process of SI. In addition, since a shift in the polarity behavior of SI to the basolateral membrane did not occur by ALPK1 depletion, the sorting step does not depend on the level of ALPK1.

Finally, we checked whether a knockdown of ALPK1 influences the phosphorylation of myosin I on isolated vesicles. Fig. 6, D and E, indicates that SAVs isolated from ALPK1 depleted cells showed a significant reduction of ³²P incorporation into the 105-kDa myosin I band. As a consequence, we observed a correlation between the phosphorylation status of myosin I and the intracellular ALPK1 concentration. Thus, we suggest that ALPK1 plays a role in the phosphorylation of myosin I.

DISCUSSION

Until now, several proteins have been postulated to be involved in apical targeting and the formation of lipid rafts as transport platforms. Among them is the MAL/VIP17 proteolipid that is required for the transport of different apical protein markers (27, 28). Additional molecules such as annexin 13b (29) and annexin II (24) are candidates for a link between the newly formed transport carriers and the actin cytoskeleton. Here, the presence of actin-binding proteins such as myosin Ia (16, 30) and myosin Vb (31) suggests their implication in vesicle movement or fission. This is indicated by experiments with a dominant negative inhibitor of myosin Vb, which decreases the efficiency of apical transport (31). Furthermore, the localization and function of myosin motors can be triggered by phosphorylation (32–34). Very recently, it has been demonstrated that Cdc42-dependent myosin II light chain phosphorylation mediates cell motility (35). A tight regulation of the cascades involved here is absolutely required since Cdc42 moreover controls cell polarity (36). Major signaling cascades have also been shown to play a key role in the regulation of intracellular organelle transport. Kashina *et al.* (37) defined “regulated motor units” characterized by the association of protein kinase A and dynein or kinesin II/myosin V motors. Thus, this complex is directly connected to the cAMP signaling pathway. In addition, the myosin V-driven organelle transport is differently controlled during the cell cycle (38). A kinase responsible for myosin V phosphorylation is calcium/calmodulin-dependent kinase II, which is required for activation of myosin V-based movements.

ALPK1 on apical transport vesicles belongs to a newly discovered protein kinase family that has no sequence homology to conventional protein kinases (39). However, their catalytic domains appeared to be homologous to the catalytic domain of myosin heavy chain kinase A from *Dictyostelium*. This new family of protein kinases was named α -kinase, based on the evidence that these protein kinases phosphorylate amino acids located within α -helices. Interestingly, a very recent work describes the identification of a new α -kinase in Golgi-like structures from *Dictyostelium*, which is, like ALPK1, characterized by a catalytic domain located at the C terminus of the polypeptide (40). Furthermore, TRPM7/ChK1 channel kinase, another member of this family, has recently been shown to phosphorylate annexin 1, a cytosolic linker molecule involved in protein transport (41). This observation would suggest that an α -ki-

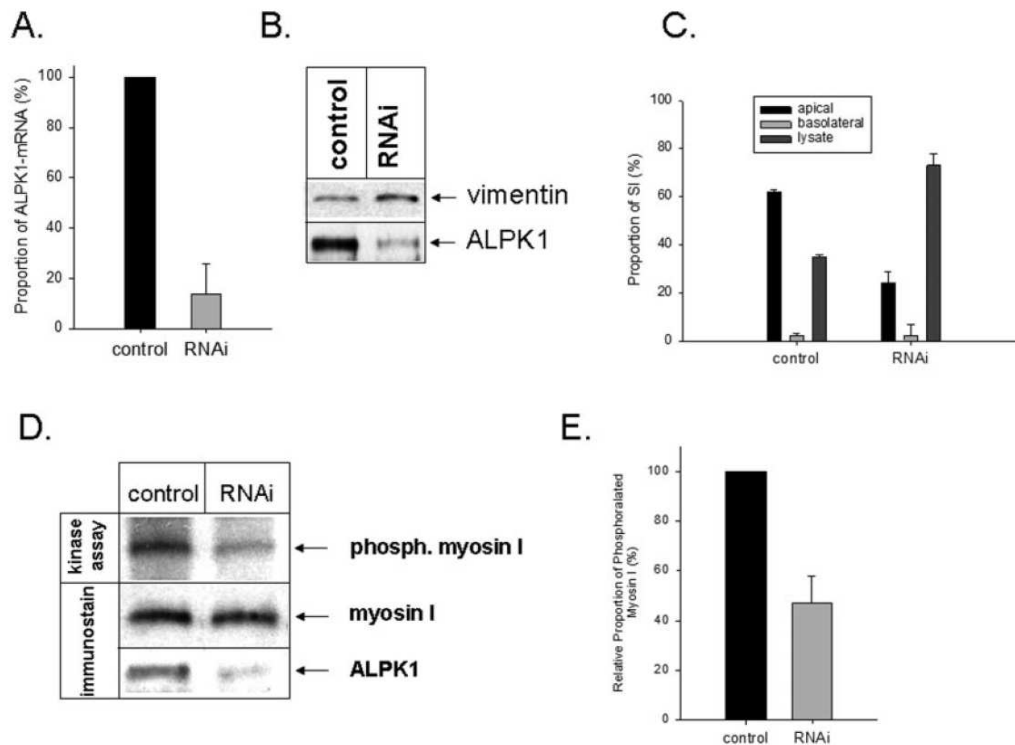


FIG. 6. Impact of ALPK1 depletion on apical transport of SI and on phosphorylation of myosin I on isolated vesicles. Caco-2 cells were transfected with ALPK1-siRNA or nonspecific luciferase siRNA as a control. 48 h after transfection, the ALPK1 depletion was analyzed by quantitative RT-PCR (A) or Western blot with pAb anti-myosin I or mAb anti-vimentin as a control (B). C, Caco-2 cells were grown on *trans*-membrane filters and biosynthetically labeled with [35 S]methionine for 4 h in the presence or absence of RNA interference. Cell surface immunoprecipitation of SI from the apical or basolateral membranes was performed with mAb anti-SI. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE followed by phosphorimaging analysis. The quantification of three independent experiments is depicted. D, SAVs were isolated from MDCK-SI-YFP cell homogenates grown in the presence or absence of ALPK1-siRNA. Vesicles were incubated for 60 min at 37 °C in the presence of [γ - 32 P]ATP, and the samples were subjected to SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose, and analyzed by phosphorimaging (kinase assay) or Western blot with pAb anti-myosin I or pAb anti-ALPK1. E, the proportion of phosphorylated myosin I to myosin I quantified from four independent experiments.

nase is capable of regulating intracellular trafficking processes by phosphorylation. The present study even goes one step further and demonstrates that knocking down ALPK1 reduces the surface delivery of SI, a model protein for apical transport. In view of the presence of myosin Ia on SI-containing apical vesicles, a close correlation between ALPK1-activity and myosin phosphorylation was assessed. The resulting data presented here suggest that ALPK1 depletion impairs the phosphorylation of myosin Ia on SI-containing vesicles. Nevertheless, it still remains an open question whether this actin motor catalyzes the active movement of SAVs along actin filaments, which has to be solved in the future.

In epithelial cells, myosin Ia is localized to the apical brush border and forms a helical array around polarized actin bundles (42). Recent studies suggest an involvement of myosin Ia in the retention of SI at the brush border (43). However, further data indicate that myosin Ia is also involved in membrane traffic of polarized cells. Expression of a dominant negative form of myosin Ia in Caco-2 cells affects the *trans*-epithelial transport from basolateral to apical, thus demonstrating that acto-myosin-driven mechanisms are involved in intracellular routing and the final delivery of apical marker proteins (44). Thus, the observed increase in the expression of ALPK1 during epithelial cell differentiation and polarization appears to be linked to a putative role of this kinase in the phosphorylation and regulation of myosin Ia. As a conclusion, ALPK1, a new component of the apical transport machinery, is a putative candidate for the regulation of polarized trafficking in enterocytes.

Acknowledgments—We thank Drs. I. Meza (IPN), I. Baines (MPI Heidelberg), and E. Korn (National Institutes of Health) for providing pAb anti-myosin I antibodies and Drs. H.P. Hauri (Biocenter, University of Basel) and E. Sterchi (University of Bern) for supplying us with mAb anti-SI.

REFERENCES

- Mostov, K., Su, T., and ter Beest, M. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 287–293
- Casanova, J. E., Apodaca, G., and Mostov, K. E. (1991) *Cell* **66**, 65–75
- Honing, S., and Hunziker, W. (1995) *J. Cell Biol.* **128**, 321–332
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., and Mellman, I. (1991) *Cell* **66**, 907–920
- Thomas, D. C., Brewer, C. B., and Roth, M. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3313–3320
- Folsch, H., Ohno, H., Bonifacio, J. S., and Mellman, I. (1999) *Cell* **99**, 189–198
- Simmen, T., Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R., and Hunziker, W. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 154–159
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569–572
- Muniz, M., and Riezman, H. (2000) *EMBO J.* **19**, 10–15
- Lin, S., Naim, H. Y., Rodriguez, A. C., and Roth, M. G. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 51–57
- Alfalalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K. P., Naim, H., and Naim, H. Y. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 593–596
- Jacob, R., Alfalah, M., Grunberg, J., Obendorf, M., and Naim, H. Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6566–6572
- Polishchuk, R., Di Pentima, A., and Lippincott-Schwartz, J. (2004) *Nat. Cell Biol.* **6**, 297–307
- Van IJzendoorn, S. C., Maier, O., Van Der Wouden, J. M., and Hoekstra, D. (2000) *J. Cell Physiol.* **184**, 151–160
- Jacob, R., and Naim, H. Y. (2001) *Curr. Biol.* **11**, 1444–1450
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., and Naim, H. Y. (2003) *Curr. Biol.* **13**, 607–612
- Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W., and Taube, D. (1990) *Electrophoresis* **11**, 101–117
- Hauri, H. P., Sterchi, E. E., Bienz, D., Fransen, J. A., and Marxer, A. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 838–851
- Ryazanova, L. V., Pavur, K. S., Petrov, A. N., Dorovkov, M. V., and Ryazanov, A. G. (2001) *Mol. Biol. (Mosc.)* **35**, 271–283
- Jacob, R., Brewer, C., Fransen, J. A., and Naim, H. Y. (1994) *J. Biol. Chem.*

21. Futey, L. M., Medley, Q. G., Cote, G. P., and Egelhoff, T. T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 523–529
22. Luo, X., Crawley, S. W., Steimle, P. A., Egelhoff, T. T., and Cote, G. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 17836–17843
23. Pavur, K. S., Petrov, A. N., and Ryazanov, A. G. (2000) *Biochemistry* **39**, 12216–12224
24. Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K. P., Rescher, U., Gerke, V., and Naim, H. Y. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 3680–3684
25. Ryazanov, A. G., Ward, M. D., Mendola, C. E., Pavur, K. S., Dorovkov, M. V., Wiedmann, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parmar, T. G., Prostko, C. R., Germino, F. J., and Hait, W. N. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4884–4889
26. Ryazanova, L. V., Dorovkov, M. V., Ansari, A., and Ryazanov, A. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 3708–3716
27. Cheong, K. H., Zacchetti, D., Schneeberger, E. E., and Simons, K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6241–6248
28. Puertollano, R., Martin-Belmonte, F., Millan, J., de Marco, M. C., Albar, J. P., Kremer, L., and Alonso, M. A. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 141–151
29. Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., and Simons, K. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 1413–1427
30. Montes de Oca, G., Lezama, R. A., Mondragon, R., Castillo, A. M., and Meza, I. (1997) *Arch. Med. Res.* **28**, 321–328
31. Brock, S. C., Goldenring, J. R., and Crowe, J. E., Jr. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15143–15148
32. Swanlung-Collins, H., and Collins, J. H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3445–3454
33. Zot, H. G., Doberstein, S. K., and Pollard, T. D. (1992) *J. Cell Biol.* **116**, 367–376
34. Egelhoff, T. T., Lee, R. J., and Spudich, J. A. (1993) *Cell* **75**, 363–371
35. Wilkinson, S., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (2005) *Nat. Cell Biol.* **7**, 255–261
36. Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004) *Dev. Biol.* **265**, 23–32
37. Kashina, A. S., Semenova, I. V., Ivanov, P. A., Potekhina, E. S., Zaliapin, I., and Rodionov, V. I. (2004) *Curr. Biol.* **14**, 1877–1881
38. Wollert, T., Weiss, D. G., Gerdes, H. H., and Kuznetsov, S. A. (2002) *J. Cell Biol.* **159**, 571–577
39. Ryazanov, A. G., Pavur, K. S., and Dorovkov, M. V. (1999) *Curr. Biol.* **9**, R43–R45
40. Betapudi, V., Mason, C., Licate, L., and Egelhoff, T. T. (2005) *Mol. Biol. Cell*
41. Dorovkov, M. V., and Ryazanov, A. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50643–50646
42. Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1995) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 633–675
43. Tyska, M. J., and Mooseker, M. S. (2004) *J. Cell Biol.* **165**, 395–405
44. Durrbach, A., Raposo, G., Tenza, D., Louvard, D., and Coudrier, E. (2000) *Traffic* **1**, 411–424

Requirement for Galectin-3 in Apical Protein Sorting

Delphine Delacour,¹ Catharina I. Cramm-Behrens,¹
Hervé Drobecq,² Andre Le Bivic,³ Hassan Y. Naim,⁴
and Ralf Jacob^{1,*}

¹Department of Cell Biology and Cell Pathology
University of Marburg
D-35033 Marburg
Germany

²Centre National de la Recherche Scientifique
Unité Mixte de Recherche 8525
Institut de Biologie
Institut Pasteur de Lille
59045 Lille
France

³Laboratoire de Neurogenese et Morphogenese au
cours du Developpement et chez l'Adulte (NMDA)
Institut de Biologie du Developpement
de Marseille (IBDM)
Faculte des Sciences de Luminy
13288 Marseille
France

⁴Department of Physiological Chemistry
School of Veterinary Medicine
30559 Hannover
Germany

Summary

The central aspect of epithelial cells is their polarized structure, characterized by two distinct domains of the plasma membrane, the apical and the basolateral membrane. Apical protein sorting requires various signals and different intracellular routes to the cell surface. The first apical targeting motif identified is the membrane anchoring of a polypeptide by glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) [1, 2]. A second group of apical signals involves N- and O-glycans [3], which are exposed to the luminal side of the sorting organelle. Sucrase-isomaltase (SI) and lactase-phlorizin hydrolase (LPH), which use separate transport platforms for trafficking, are two model proteins for the study of apical protein sorting. In contrast to LPH, SI associates with sphingolipid/cholesterol-enriched membrane microdomains or "lipid rafts" [4–6]. After exit from the *trans*-Golgi network (TGN), the two proteins travel in distinct vesicle populations, SAVs (SI-associated vesicles) and LAVs (LPH-associated vesicles) [7, 8]. Here, we report the identification of the lectin galectin-3 delivering non-raft-dependent glycoproteins in the lumen of LAVs in a carbohydrate-dependent manner. Depletion of galectin-3 from MDCK cells results in missorting of non-raft-dependent apical membrane proteins to the basolateral cell pole. This suggests a direct role of galectin-3 in apical sorting as a sorting receptor.

Results and Discussion

For the identification of protein components in LAVs or SAVs, post-Golgi-enriched gradient fractions were separated by two-dimensional (2D) electrophoresis before or after immunoisolation. The identity of the LAV- or SAV-associated proteins was determined by MALDI-TOF-TOF analysis. Figure 1A shows that post-Golgi-enriched fractions of MDCK cells revealed the presence of the two polypeptides annexin-2 and galectin-3. Following immunoisolation, we could corroborate our previous observations that annexin-2 exclusively accumulates in SAVs [9]. On the other hand, an enrichment of the lectin galectin-3 was identified in immunisolated LAVs. Furthermore, this lectin did not precipitate with SAVs, and we could confirm the exclusive presence of galectin-3 in LAVs by western blotting and immunoelectron microscopy (Figures 1B and 1C). On the basis of the finding that LAVs are characteristic for delivering the non-raft-associated hydrolase LPH to the apical cell surface [7], we also checked by floating analysis the association of galectin-3 with detergent-resistant membrane microdomains (DRMs), a characteristic biochemical feature of lipid rafts [10]. For comparison, the distribution of LPH, SI, and the raft-marker protein caveolin-1 was monitored by western blot analysis. Figure 1D demonstrates that significant quantities of SI and caveolin-1 were isolated from the floating DRM fractions of the gradient, whereas galectin-3 and LPH did not float but remained in the bottom fractions. This indicates that galectin-3, like LPH, is not associated with the lipid-based apical-transport platforms.

We then examined the subcellular localization of galectin-3 by confocal fluorescence microscopy. For this, fluorescent fusion proteins of galectin-3 were generated. Expression of these constructs in COS-1 cells allows the analysis of intracellular organelles in a single focal plane by confocal microscopy. Here, Gal3-CFP labeling was predominantly found in some areas of the cytosol and vesicular or tubular structures (Figure 2A). Thus, the staining pattern of Gal3-CFP reflects the intracellular distribution described for endogenous galectin-3 [11]. Gal3-CFP-positive vesicles did not contain *trans*-Golgi-galactosyltransferase (GT-CFP) or the lysosomal membrane protein LAMP-2, but galectin-3 labeling overlapped in part with rab11-positive recycling endosomes, which are involved in apical membrane trafficking [12]. Gal3-CFP/LPH-YFP- or SI-YFP-expressing COS-1 cells contained galectin-3 with LPH- or SI-carrying vesicles in the perinuclear area (Figure 2B). Following TGN release for 20 min, vesicles labeled by Gal3-CFP and LPH-YFP appeared in the cell periphery. To determine whether costaining between Gal3-CFP and LPH-YFP reflects a close contact between the two partners, we performed fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis. In 30 vesicles analyzed, 20.11% \pm 2.35% FRET efficiency was measured for galectin-3 and LPH. However, no FRET (0.1% \pm 0.02% efficiency) could be detected between galectin-3 and SI, thus

*Correspondence: jacob@staff.uni-marburg.de

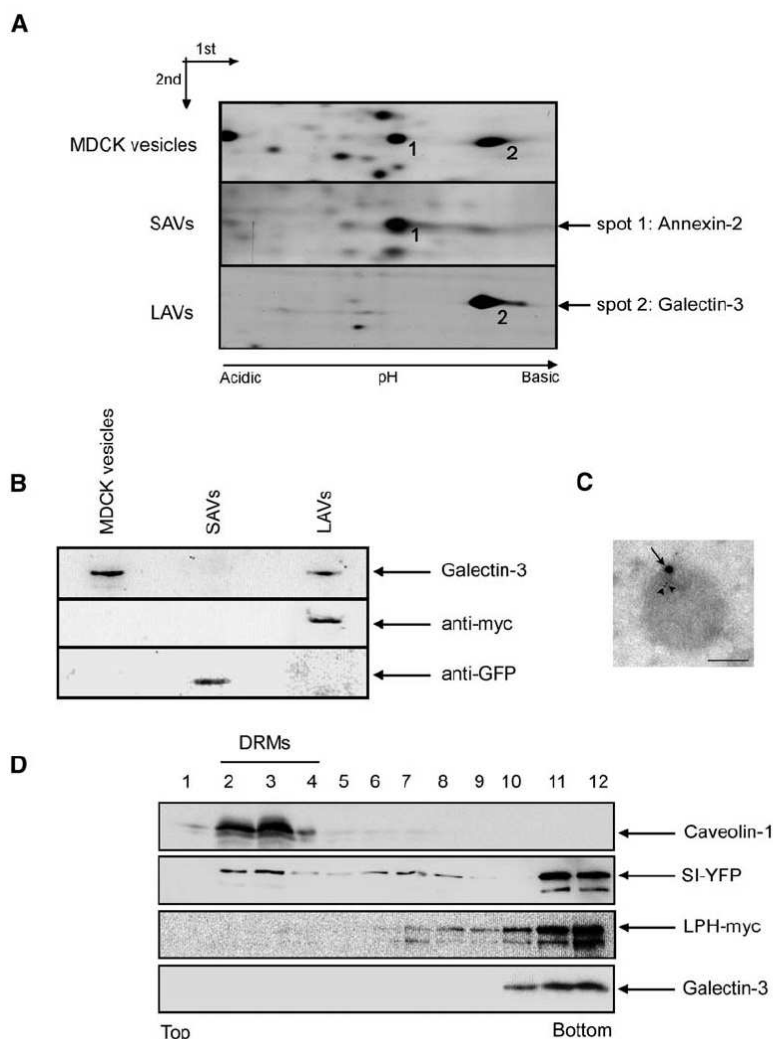


Figure 1. Galectin-3 Is Specifically Associated with LAVs

(A) MDCK, MDCK-LPH_{myc}, and MDCK-SI-YFP cells were incubated at 20°C for 4 hr followed by TGN-release at 37°C for 20 min. The cell homogenates were separated on a step sucrose gradient, and vesicles of TGN-38 positive fractions were pelleted at 100,000 × g (MDCK vesicles) or immunoprecipitated with mAb anti-GFP (SAVs) or anti-myc (LAVs). The precipitates were separated by 2D electrophoresis and silver-stained. Spots identified by MALDI-TOF-TOF are indicated.

(B) Vesicles were isolated as indicated above, separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and stained with pAb anti-galectin-3, mAb anti-myc, or mAb anti-GFP.

(C) Immunogold labeling of immunisolated LAVs. Galectin-3 (arrow) was labeled with 20 nm gold particles and LPH (arrowhead) by 8 nm gold. The bar represents 100 nm.

(D) Membrane fractions of MDCK-SI-YFP or MDCK-LPH_{myc} cells were solubilized with Triton X-100 at 4°C, and the detergent extracts were loaded onto a step sucrose gradient. Each gradient was divided into 12 fractions. Following TCA-precipitation, each fraction was subjected to SDS-PAGE, blotted onto a nitrocellulose membrane, and immunostained with mAb anti-caveolin-1, anti-GFP or anti-myc, or pAb anti-galectin-3. Floating fractions containing DRMs are indicated.

demonstrating vicinity between galectin-3 and LPH in the nm-range but not with SI.

Next, the intracellular distribution of galectin-3 in polarized MDCK-cells was studied. Figure 2C demonstrates that costaining between endogenous galectin-3 and apically directed LAVs was observed in the sub-apical area of epithelial cell sheets. Again, only minor amounts of vesicles were costained for SAVs and galectin-3, a result that corroborates our 2D-electrophoresis data and the observations in COS-1 cells. We then determined the exact time interval of galectin-3 accumulation within isolated LAVs or SAVs. Therefore, a cohort of transported material was accumulated in the TGN followed by TGN release at 37°C for increasing time intervals. Western-blot analysis of immunisolated vesicles revealed the appearance of galectin-3 in LAVs 5 min after TGN release. A maximum level of this lectin in these vesicles was reached 10 min after TGN release. This level remained high for 35 min until it declined at the end of the experiment (Figure 3A). For SAVs, no significant amounts of galectin 3 could be detected, indicating that galectin-3 accumulates in the non-raft-dependent apical route after exit of the TGN. Next, we wanted to identify whether galectin-3 localizes on the cytosolic or the luminal side of vesicular carriers. Therefore, LAVs

were lysed or not lysed with 1% Triton X-100, followed by proteinase K treatment and western-blot analysis with pAb anti-galectin-3. As depicted in Figure 3B, galectin-3 isolated by vesicle precipitation was resistant to proteinase K digestion unless LAVs were solubilized with Triton X-100. This demonstrates that galectin-3 accumulates on the luminal side of post-Golgi vesicles.

Another question based on the FRET experiments in COS-1 cells was whether in MDCK cells galectin-3 and LPH directly associate with each other in the vesicle lumen. For this purpose, LPH or SI was immunoprecipitated from MDCK cell lysates, and this was followed by immunoblot analysis of the coprecipitated galectin-3 in the presence or absence of glucose, galactose, or lactose (Figure 3C). In the control experiment and in the presence of glucose, galectin-3 was isolated in association with LPH. Galactose and lactose on the other hand inhibited this association, thus suggesting that in contrast to glucose, these two sugars compete with the binding of galectin-3 for LPH. Because the disaccharide lactose comprises glucose as well as galactose, our observations point to a galactose-dependent interaction of galectin-3 with LPH. In conjunction with the FRET data in COS-1 cells, no coprecipitation of galectin-3 with SI could be detected in MDCK cells.

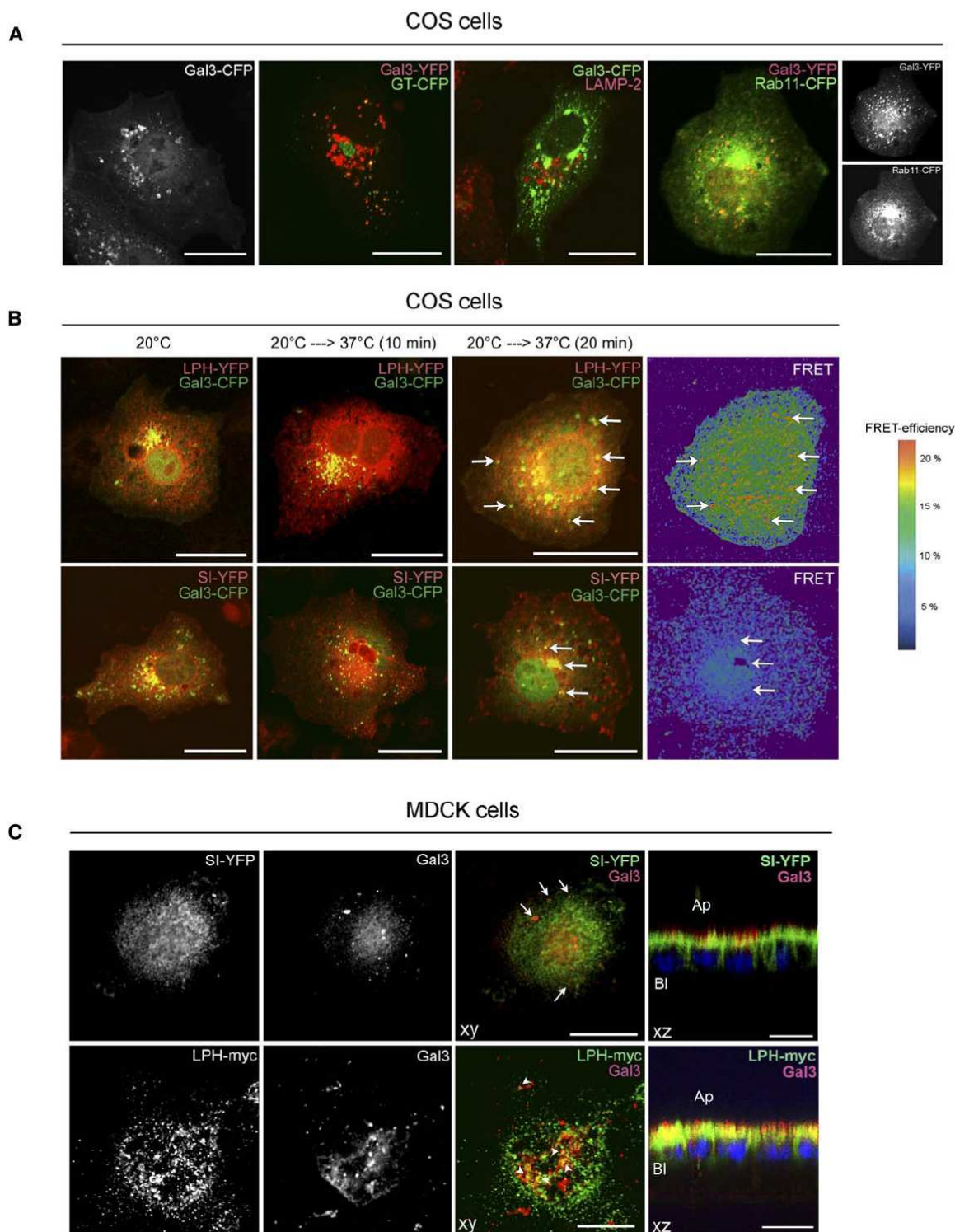


Figure 2. Galectin-3 Is Colocalized with LPH in COS-1 and MDCK Cells

(A) COS-1 cells were transfected with Gal3-CFP or combinations of Gal3-CFP/-YFP and GT-CFP or rab11-CFP. Forty-eight hours after transfection, the cells were fixed, immunostained with anti-LAMP-2/anti-mouse Alexa 633 when indicated, and analyzed by confocal microscopy.

(B) COS-1 cells transfected with combinations of LPH-YFP/Gal3-CFP or SI-YFP/Gal3-CFP were fixed after accumulation of the transported material in the TGN at 20°C or subsequent TGN release at 37°C for 10 or 20 min. The corresponding FRET efficiency patterns of cells analyzed 20 min after TGN release are depicted on the right. Vesicular structures indicated by arrows showed a FRET efficiency of 15%–20% between Gal3-CFP and LPH-YFP. For SI-YFP, no significant FRET efficiency could be detected in vesicles with Gal3-CFP as depicted by arrows.

(C) Endogenous galectin-3 of fixed filter-grown MDCK-LPH_{myc} or MDCK-SI-YFP cells was immunostained with pAb anti-galectin-3 and anti-rabbit Alexa 633. For LPH_{myc}-staining, mAb anti-myc in combination with anti-mouse Alexa 488 were applied. Cells were scanned in the

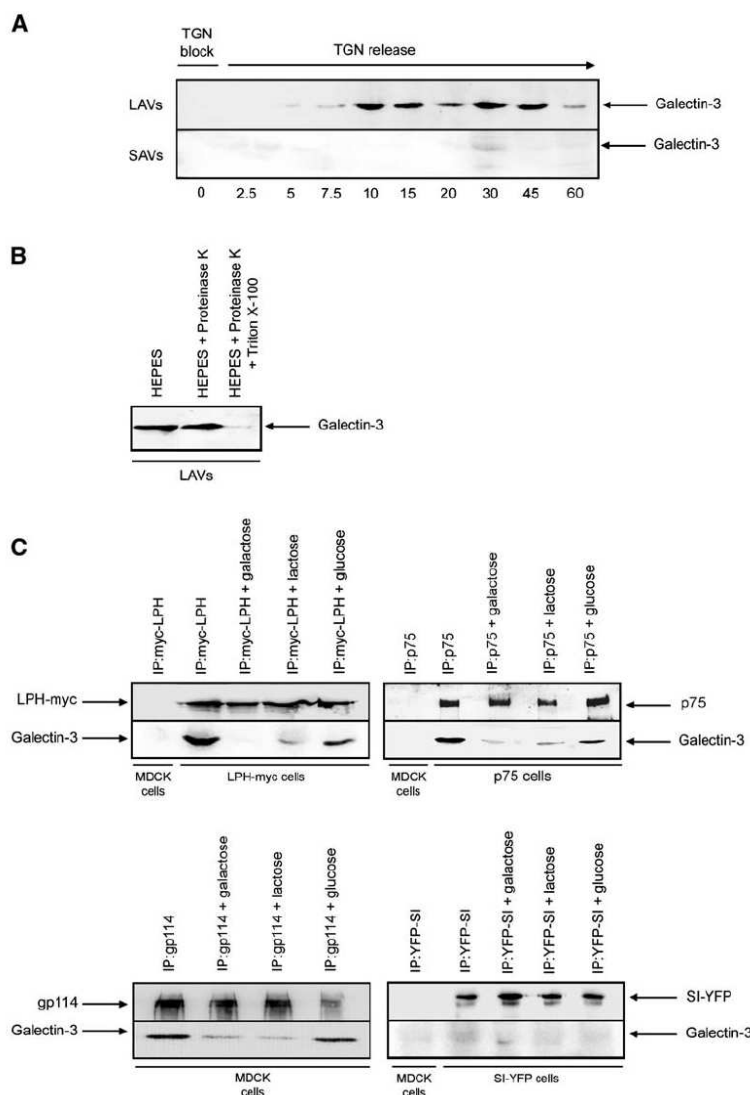


Figure 3. Galectin-3 Interacts with Glycoproteins in the Lumen of LAVs

(A) For a TGN accumulation of newly synthesized material, MDCK-LPH_{myc} and MDCK-SI-YFP cells were incubated at 20°C for 4 hr followed by TGN release at 37°C for the indicated time points. The galectin-3 content in immunisolated LAVs or SAVs was detected by immunoblot.

(B) LAVs were treated or not treated with proteinase K in the presence or absence of Triton X-100. The samples were loaded on SDS-PAGE and processed for immunoblot with pAb anti-galectin-3.

(C) The coprecipitation efficiency of galectin-3 with LPH, SI, p75, or gp114 was assessed by immunoprecipitation (IP) of LPH_{myc}, SI-YFP, p75, or gp114 from lysates of MDCK-LPH_{myc}, MDCK-SI-YFP, MDCK-p75, or MDCK cells. Lysates from MDCK cells were used as negative control. Precipitation was performed in the presence or absence of 0.3 M galactose, 0.1 M lactose, or 0.3 M glucose solutions followed by western-blot analysis of the immunoprecipitates.

On the basis of the successful coprecipitation of galectin-3 with LPH, we tested the general character of galectin-3 as a receptor in apical protein sorting. Here, we used two other apical non-raft-associated membrane proteins, the neurotrophin receptor (p75) [13] and gp114, an endogenous apical glycoprotein of MDCK cells [14, 15]. At first, p75 or gp114 was precipitated from cell lysates, and galectin-3 was detected on immunoblots as indicated above. Figure 3C depicts coprecipitation of galectin-3 with p75 and gp114 in the presence of glucose as well as under control conditions. In analogy to LPH, a significant decline in the interaction of p75 or gp114 with the lectin could be observed in the presence of galactose or lactose. As a conclusion, galectin-3 binds to the apical glycoproteins LPH, p75, and gp114 in a galactose-dependent fashion, whereas raft-associated SI travels independently of this lectin to the cell surface.

We wondered whether apical sorting in MDCK cells depends on the presence of galectin-3 and studied a putative role of this lectin in the sorting process by RNA interference with two specific siRNA duplexes. The level of galectin-3 was reduced to less than 20% according to western-blot analysis 48 hr after transfection (Figure 4A). Moreover, 72 hr after transfection of a combination of both siRNA duplexes, an even more dramatic decrease of galectin-3 expression could be observed by western-blot and quantitative RT-PCR (Figures 4A and 4B). We employed these conditions for galectin-3 knockdown to monitor the polarized delivery of LPH, p75, gp114, or SI in polarized MDCK cells by confocal imaging. Interestingly, galectin-3 depletion caused a shift of LPH, p75, and gp114 from the apical membrane to a predominant quantity in the basolateral plasma membrane (Figure 4C). Apart from their appearance in the basolateral membrane, LPH and gp114 also

subapical area (xy) or in x/z view (xz). Vesicular carriers exclusively labeled with galectin-3 (white arrows) are depicted. Vesicular structures contained by galectin-3 and LPH_{myc} are indicated by arrowheads. Hoechst nuclear counterstaining is indicated in blue. Ap denotes apical; BI denotes basolateral. The scale bars represent 10 μ m.

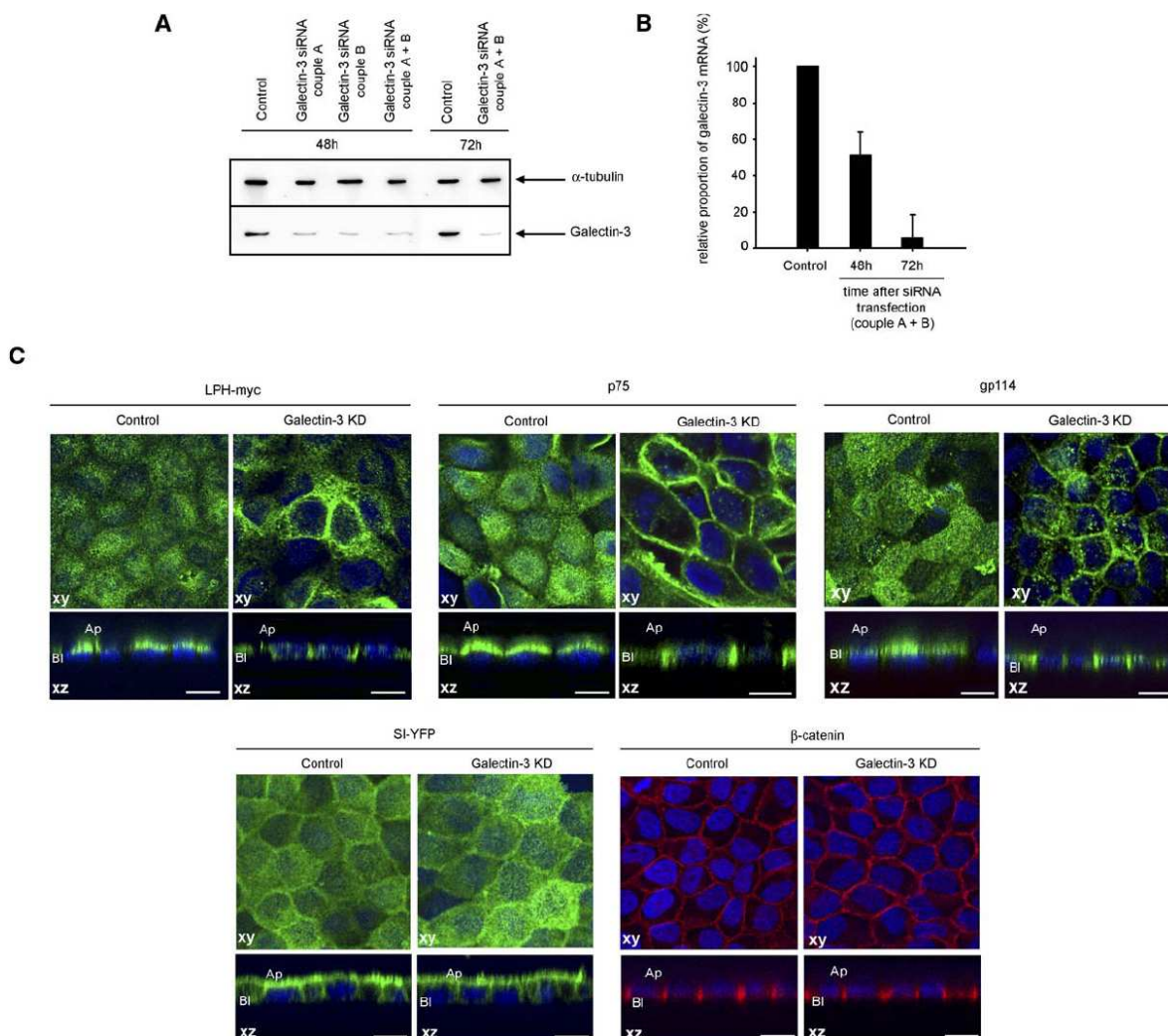


Figure 4. Disturbed Apical Targeting of Non-Raft-Associated Proteins after Galectin-3 Knockdown

(A and B) MDCK cells were transfected with galectin-3-specific siRNA-duplexes or nonspecific luciferase siRNA as control. Forty-eight or seventy-two hours after transfection, the galectin-3 knockdown (KD) was analyzed by western blot with pAb anti-galectin-3 and mAb anti- α -tubulin as internal control (A) or quantitative RT-PCR (B).

(C) Filter-grown MDCK-LPH_{myc}, MDCK-SI-YFP, MDCK-p75, or MDCK cells were transiently transfected with galectin-3 or luciferase siRNA as control. Seventy-two hours after transfection, the cells were fixed and immunostained with mAb anti-LPH, anti-p75, anti-gp114, or anti- β -catenin followed by anti-mouse Alexa 488 or 633 as secondary antibody. Monolayers of cells were studied in xy or xz direction as indicated. The cell nuclei are depicted in blue. Ap denotes apical; Bl denotes basolateral. The scale bars represent 10 μ m.

accumulated intracellularly after galectin-3 depletion; this accumulation might be due to an inefficient entry into alternative transport routes. Basolateral delivery of p75 can be explained by sorting signals in its cytosolic domain [16]. However, apical SI was correctly sorted in the presence or absence of galectin-3. No influence of galectin-3 depletion could be observed on the basolateral localization of β -catenin. In a second approach, the polypeptides were precipitated from the apical or basolateral surface of biosynthetically labeled MDCK cells. Again, apical sorting of the non-raft-associated proteins was significantly perturbed by galectin-3 knockdown to an average apical to basolateral ratio of about 52:48 (LPH) or 38:62 (p75), whereas no effect on the polarized targeting of raft-associated SI molecules could be detected (Figures 5A and 5B).

Taken together, both techniques we employed to determine an influence of galectin-3 knockdown on the sorting of non-raft-associated apical glycoproteins have shown that they are missorted to the basolateral membrane in the absence of galectin-3. This effect on polarized trafficking supports the notion that galectin-3 is required for the high fidelity of non-raft-dependent apical sorting in MDCK cells. Moreover, in view of the observations that galectin-3 accumulates in post-Golgi carriers and interacts with LPH, p75, and gp114, this lectin fulfils the requirements of an apical sorting receptor.

Already ten years ago, different groups came to the conclusion that sugar binding receptors might be involved in apical transport by direct interaction with sugar moieties of glycoproteins [4, 13, 17]. A candidate lectin, which was first identified in exocytic carriers,

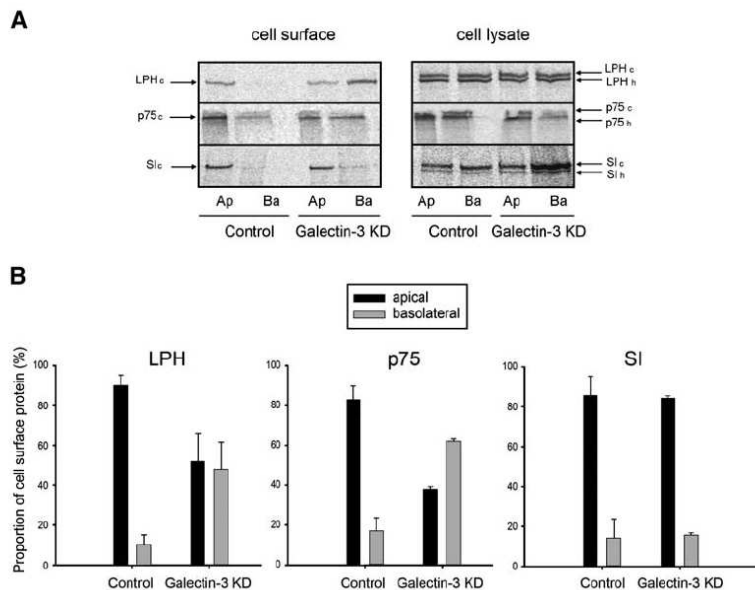


Figure 5. Galectin-3 Depletion Increases Basolateral Delivery of Non-Raft-Associated Apical Proteins

(A) MDCK-LPH_{myc}, MDCK-SI-YFP, or MDCK-p75 cells were grown on transmembrane filters and biosynthetically labeled with [³⁵S]methionine for 5 hr in the presence or absence of RNAi. Cell-surface immunoprecipitation of LPH_{myc}, SI-YFP, or p75 from the apical or basolateral membranes was performed with the corresponding antibodies. LPH_{myc}, SI-YFP, and p75 were precipitated from the remaining cell lysates for comparison. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE followed by phosphorimaging analysis. High-mannose (LPH_h, SI_h) or complex glycosylated forms (LPH_c, SI_c) of LPH and SI are indicated. Ap denotes apical; Ba denotes basolateral.

(B) The quantification (\pm standard errors) of three independent experiments is depicted.

was VIP36 [18]. However, this localization was caused by overexpression of VIP36, whereas the endogenous pool accumulates in the *cis*-Golgi [19]. Thus, direct involvement of this lectin in apical sorting at the *trans* side of the Golgi appears to be unlikely. Recently, galectin-4 was identified in post-Golgi carriers [20]. Depletion of this lectin induces mistargeting of apical proteins. However, no clear interaction of galectin-4 with glycoproteins could be observed. Instead, it associates with sulfatides, which are highly enriched in lipid rafts. This suggests that galectin-4 is engaged in the process of raft formation or stabilization instead of sorting glycosylated polypeptides.

It is well known that galectins provide the ability to form cross-linked lattices with specific multivalent carbohydrates. Galectin-3 differs from other galectins in having one carbohydrate recognition domain and an additional dimerization domain [21]. This dimer formation enables galectin-3 to form multimeric complexes with the extracellular matrix protein hensin in epithelial cells [22]. How galectin-3 is secreted via a "nonclassical" secretory pathway is unclear [11]. It might be translocated through the plasma membrane and taken up by endocytosis or directly transported into exocytic carriers. Because we observed accumulation of galectin-3 in post-Golgi carriers 10 min after TGN release, this interaction most likely intensifies in an endosomal compartment. Evidence for the involvement of endosomes in exocytic polarized trafficking comes from studies on the polymeric IgA receptor [23], the VSVG protein [24], the transferring receptor [25], the asialoglycoprotein receptor [26], and E-cadherin [27]. In addition, the observation that apical and basolateral cargo pass a population of recycling endosomes further suggests that these endosomes serve not merely as an intermediate compartment between TGN and plasma membrane but also as a common site for polarized sorting [24].

Apical sorting of raft-associated as well as of non-raft-associated polypeptides involves the presence of N- or O-glycans [3]. Because galectins recognize β -galactose,

which is present in N- and O-glycans, they represent putative candidates for binding receptors. Furthermore, our data demonstrate that galectin-3 depletion disturbs apical segregation of the non-raft-associated proteins LPH and p75, whereas polarized trafficking of SI remains unaffected. Two conclusions can be drawn from this observation. First, galectin-3 binding underlies one variant of carbohydrate-dependent apical sorting. Second, galectin-3 is not involved in protein translocation to the cell surface but represents a central element in the apical sorting process of non-raft-associated glycoproteins.

Moreover, our data indicate that the arrangement of clusters consisting of glycoproteins and galectin-3 plays a central role in apical sorting. This observation of networks between apical proteins corresponds to a model that is based on the oligomerization of polypeptides into clusters that drive apical sorting and assist in the generation of apical vesicles [28]. Thus, it is tempting to conclude that galectin-3 fulfills the role of a receptor that recognizes apical glycoproteins, drives the oligomerization process, and stabilizes the network for vesicle formation.

Supplemental Data

Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures and are available with this article online at: <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/16/4/408/DC1/>.

Acknowledgments

We are grateful to W. Ackermann, M. Dienst, B. Agricola, and M. Hess for technical assistance. We thank Dr. H.P. Hauri (Biocenter, University of Basel) and Dr. H.P. Elsaesser (University of Marburg) for supplying us with mAb anti-LPH, anti-SI, and pAb anti-galectin-3. The plasmid prab11-GFP was kindly provided by Dr. A. Wandinger-Ness (University of New Mexico). This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn, Germany (grants JA 1033/1-2 (to H.Y.N. and R.J.); by the Sonderforschungsbereich 593 (to R.J.); by the International relationships INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale)-DFG (to D.D.); and by La Ligue contre le Cancer (to A.L.B.). Additional support was provided by the Alfred und Ursula Kulemann Stiftung (to R.J.).

Received: October 10, 2005
 Revised: December 5, 2005
 Accepted: December 28, 2005
 Published: February 21, 2006

References

- Brown, D.A., Crise, B., and Rose, J.K. (1989). Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 245, 1499–1501.
- Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davitz, M.A., and Rodriguez-Boulan, E. (1989). A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 109, 2145–2156.
- Rodriguez-Boulan, E., and Gonzalez, A. (1999). Glycans in post-Golgi apical targeting: Sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol.* 9, 291–294.
- Alfalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K.P., Naim, H., and Naim, H.Y. (1999). O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr. Biol.* 9, 593–596.
- Danielsen, E.M. (1995). Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes. *Biochemistry* 34, 1596–1605.
- Mirre, C., Monlauzeur, L., Garcia, M., Delgrossi, M.H., and Le Bivic, A. (1996). Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin. *Am. J. Physiol.* 273, c887–c894.
- Jacob, R., and Naim, H.Y. (2001). Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr. Biol.* 11, 1444–1450.
- Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., and Naim, H.Y. (2003). Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr. Biol.* 13, 607–612.
- Jacob, R., Heine, M., Eikemeyer, J., Frerker, N., Zimmer, K.P., Rescher, U., Gerke, V., and Naim, H.Y. (2004). Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 3680–3684.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S.H., Mostov, K.E., and Leffler, H. (1993). Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 268, 11750–11757.
- Prekeris, R., Klumperman, J., and Scheller, R.H. (2000). A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes. *Mol. Cell* 6, 1437–1448.
- Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 139, 929–940.
- Le Bivic, A., Sambuy, Y., Mostov, K., and Rodriguez-Boulan, E. (1990). Vectorial targeting of an endogenous apical membrane sialoglycoprotein and ovomucin in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 110, 1533–1539.
- Verkade, P., Harder, T., Lafont, F., and Simons, K. (2000). Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 148, 727–739.
- Monlauzeur, L., Rajasekaran, A., Chao, M., Rodriguez-Boulan, E., and Le Bivic, A. (1995). A cytoplasmic tyrosine is essential for the basolateral localization of mutants of the human nerve growth factor receptor in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270, 12219–12225.
- Fiedler, K., and Simons, K. (1995). The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81, 309–312.
- Fiedler, K., Parton, R.G., Kellner, R., Etzold, T., and Simons, K. (1994). VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells. *EMBO J.* 13, 1729–1740.
- Fullekrug, J., Scheiffele, P., and Simons, K. (1999). VIP36 localisation to the early secretory pathway. *J. Cell Sci.* 112, 2813–2821.
- Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J.P., Drobek, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., Andre, S., et al. (2005). Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J. Cell Biol.* 169, 491–501.
- Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., and Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 269, 20807–20810.
- Hikita, C., Vijayakumar, S., Takito, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Al Awqati, Q. (2000). Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J. Cell Biol.* 151, 1235–1246.
- Orzech, E., Cohen, S., Weiss, A., and Aroeti, B. (2000). Interactions between the exocytic and endocytic pathways in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 275, 15207–15219.
- Ang, A.L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L.J., Pypaert, M., Warren, G., and Mellman, I. (2004). Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 167, 531–543.
- Odorizzi, G., Pearse, A., Domingo, D., Trowbridge, I.S., and Hopkins, C.R. (1996). Apical and basolateral endosomes of MDCK cells are interconnected and contain a polarized sorting mechanism. *J. Cell Biol.* 135, 139–152.
- Leitinger, B., Hille-Rehfeld, A., and Spiess, M. (1995). Biosynthetic transport of the asialoglycoprotein receptor H1 to the cell surface occurs via endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10109–10113.
- Lock, J.G., and Stow, J.L. (2005). Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 16, 1744–1755.
- Paladino, S., Samataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., and Zurzolo, C. (2004). Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J. Cell Biol.* 167, 699–709.

Supplemental Data

Requirement for Galectin-3 in Apical Protein Sorting

Delphine Delacour, Catharina I. Cramm-Behrens, Hervé Drobecq, Andre Le Bivic, Hassan Y. Naim, and Ralf Jacob

Supplemental Experimental Procedures

Plasmid Construction

The cDNA of human galectin-3 was amplified from a Caco-2 cDNA library with the primer pair 5'-GAATTCATGGCAGACAATTTTCGC TCC-3' and 5'-GGATCCGGTATCATGGTATATGAAGCACTG-3' and ligated into the unique sites EcoRI/BamHI of the pECFP-C1 or pYFP-C1 vector (Clontech). The resulting plasmids denoted pCFP/galectin-3 or pYFP/galectin-3 were confirmed by sequencing. For the generation of prab11-CFP, the cDNA sequence of GFP was substituted by CFP in the vector prab11-GFP [S1].

Vesicle Preparation, Proteinase K Treatment, and TCA Precipitation

Post-TGN vesicles of MDCK-SI-YFP and MDCK-LPH_{myc} cells were isolated as described previously [S2]. For the enrichment of post-TGN vesicles, the cells were incubated in the presence of cycloheximide (100 µg/ml) for 4 hr at 20°C to accumulate newly synthesized material in the TGN, followed by TGN release at 37°C for definite times. The cell homogenates in HB-T buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM triethanolamine, pH 7.4) were centrifuged on a step sucrose gradient. Fractions were collected from the bottom of each gradient, and TGN-38-positive fractions were used for immunoprecipitation with monoclonal antibody (mAb) anti-GFP (Clontech) or mAb anti-myc (Invitrogen). The samples were washed six times with HB-T buffer prior to SDS-PAGE analysis. For proteinase K treatment experiments, LAVs or SAVs were washed with 10 mM HEPES, pH 7.4, 250 mM sucrose, and then incubated with proteinase K (0.5 mg/ml) in the absence or presence of 2% Triton X-100 for 30 min on ice. Enzyme treatment was stopped by TCA precipitation.

Immunochemical Reagents and Immunoblotting

Immunoblotting employed nitrocellulose membranes (Bioscience, Germany) and HRP-conjugated secondary antibodies that were visualized by ECL (Signal Plus, Pierce). For immunostaining of human SI, myc-tagged LPH, p75, or galectin-3, the mouse monoclonal antibodies (mAb) of hybridoma HBB 3/705 [S3], mAb anti-myc (Invitrogen), the mouse monoclonal ME20.4, or polyclonal antibody (pAb) anti-galectin-3 [S4] were used. MAb and pAb directed against α -tubulin and β -catenin were purchased from Sigma; mAb directed against caveolin-1 was purchased from BD Transduction Laboratories.

Cell Culture, Biosynthetic Labeling of Cells, and Immunoprecipitation

COS-1 and MDCK cells were grown in DMEM low-glucose medium or in MEM (Gibco Invitrogen Corporation), respectively, with 10% FCS at 37°C. Plasmid and siRNA transfection of COS-1 or MDCK cells was performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Pulse-chase experiments with [³⁵S]methionine of MDCK-LPH_{myc}, MDCK-SI [S2], or MDCK-p75 [S5] cells and immunoprecipitation were performed essentially as described before [S2]. For surface precipitation, biosynthetically labeled cells were incubated for 2 hr at 4°C in the presence of antibody followed by cell lysis and precipitation of the antigen-antibody complex with protein-A sepharose by centrifugation. The precipitated aliquots were washed and mAb anti-LPH, anti-SI, or anti-p75 was added to the remaining supernatants to precipitate the internal mannose-rich and complex glycosylated stores of both enzymes. The immunoprecipitates were subjected to 6% SDS-PAGE, and phosphoimages were analyzed with the Quantity One software (BioRad).

Proteomic Analysis

MDCK vesicles, SAVs, or LAVs have been solubilized in 2D buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.4% Triton X-100, 0.28% DTT, 0.2% bromophenol blue, 0.28% IPG buffer [Amersham]). Isoelectrofocusing was carried out in individual 18 cm IPG strips, pH 3–10, with an IPGPhor system (Amersham). Second-dimension gels (6%–16% acrylamide gradient) were run with the Ettan Dalt Six Cell (Amersham). Electrophoretically separated proteins were excised from silver-stained gels and processed for mass spectrometry in MALDI-TOF or in MALDI-TOF-TOF mode, with a Voyager DE STR instrument (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts) or an Ultraflex Instrument (Brucker, Germany) in the group of Dr. Lingelbach (SFB 593, Marburg). For protein identification, MALDI spectra were explored for database searches with the computer software Profound (http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe) and MASCOT (www.matrixscience.com).

Immunoelectronmicroscopy

Immunoelectronmicroscopy was performed as described previously [S6]. Double labeling was performed with rabbit anti-galectin-3 antibody and mouse anti-LPH antibody followed by the addition of 8- or 20-nm-gold-particle-labeled secondary antibodies.

Detergent-Resistant-Membrane Isolation

Detergent-resistant membranes (DRMs) have been prepared as described previously [S6]. In brief, MDCK, MDCK-SI-YFP, or MDCK-LPH_{myc} cells from six culture plates are homogenized by ten passages through blue tips, 15 passages through 25G needle, and ten passages through Dounce homogenizer, in 2 ml of HEPES buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EGTA, 250 mM sucrose, and protease inhibitors). After centrifugation, a postnuclear supernatant is brought to 1.4 M sucrose and covered with 6 ml of 1.2 M sucrose and 3 ml of 0.8 M sucrose solutions. After ultracentrifugation (38,000 RPM, 20 hr) in an SW41 rotor, a total membrane fraction is obtained at the interface 1.2 M/0.8 M.

Subsequent to pelleting, this membrane fraction is solubilized in 2 ml of TNE/TX-100 buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and protease inhibitors) for 30 min on ice. Then the sample is brought to a density of 1.2 M by mixing with 2 ml of 2.4 M sucrose solution, loaded onto the bottom of a centrifuge tube, and layered with 6 ml of 1.1 M sucrose and 2 ml of 0.15 M sucrose solutions. After ultracentrifugation (39,000 RPM, 18 hr), insoluble membranes float at the interface 1.1 M/0.15 M. Fractions of 1 ml are collected from the top of the gradient, precipitated with trichloroacetic acid, washed with acetone, and used for immunoblotting.

Confocal Fluorescence Microscopy and FRET Measurements

Confocal images of fixed or living cells were acquired on a Leica TCS SP2 microscope with a 63× water planapochromat lens (Leica Microsystems) essentially as described before [S7]. For immunostaining, the secondary antibodies anti-mouse Alexa 488/Alexa 633 and anti-rabbit Alexa 633 were purchased from Molecular Probes (Oregon). Nuclear staining was performed by Hoechst staining. For FRET acceptor, photobleaching experiments were performed on fixed cells. YFP was specifically photobleached at 514 nm, and images were acquired before (CFP^{pre}) and after (CFP^{after}) the photobleaching experiment. An increase in CFP fluorescence after photobleaching indicates FRET. FRET efficiency $E = 1 - \text{CFP}^{\text{pre}}/\text{CFP}^{\text{after}}$ was calculated from 30 vesicular structures of at least six cells per experiment.

RNA Extraction and Real-Time PCR

For RNA extraction and cDNA synthesis, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) were used. The quantitative determination of cDNA was performed with a Cepheid Smart Cycler II (Intas, Göttingen, Germany) and the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The primers used for galectin-3 amplification were 5'-AGCCTCGCATGCTGATAA-3'/5'-CATCATTGACCGCAACCT-3' and 5'-TATGTTTGAGACCTTCAACACC-3'/5'-CTCCA GAGTCCATGACAATGC-3' for γ -actin as internal reference.

RNA Interference

For RNA-mediated interference (RNAi) experiments, specific depletion of canine galectin-3 was performed with the siRNA duplexes A: 5'-AUACCAAGCUGGAUAAUAUTT-3'/3'-TTUAUGGUUCGACCU AUUUAU-5' and B: 5'-ACCCAAACCCUCAAGGAUGTT-3'/3'-TTUGG GUUUGGGAGUCCUAC-5'.

Supplemental References

- S1. Chen, W., Feng, Y., Chen, D., and Wandering-Ness, A. (1998). Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell* 9, 3241–3257.
- S2. Jacob, R., Heine, M., Alfalah, M., and Naim, H.Y. (2003). Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr. Biol.* 13, 607–612.
- S3. Hauri, H.P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A., and Marxer, A. (1985). Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 101, 838–851.
- S4. Gebhardt, A., Ackermann, W., Unver, N., and Elsasser, H.P. (2004). Expression of galectin-3 in the rat pancreas during regeneration following hormone-induced pancreatitis. *Cell Tissue Res.* 315, 321–329.
- S5. Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., and Rodriguez-Boulon, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 139, 929–940.
- S6. Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J.P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., Andre, S., et al. (2005). Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J. Cell Biol.* 169, 491–501.
- S7. Jacob, R., and Naim, H.Y. (2001). Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr. Biol.* 11, 1444–1450.

8.3

ENDOSOMES SORT APICAL CARGO INTO DISTINCT TRANSPORT CARRIERS

Catharina I. Cramm-Behrens, Martina Dienst and Ralf Jacob*

Department of Cell Biology and Cell Pathology,
Philipps-University Marburg, 35033 Marburg Germany

Running title: Endosomes in apical trafficking

Key words: apical sorting, rab, endosomes, MDCK,
TGN

*Address correspondence to Ralf Jacob, Department of Cell Biology and Cell Pathology, University of Marburg, Robert-Koch-Str. 6, D-35033 Marburg, Germany; Tel.: +49-6421-286 6482; Fax: +49-6421-286 6414; E-Mail: jacob@staff.uni-marburg.de

Numbers of characters (incl. spaces):

Abstract

Epithelial polarity is based on intracellular sorting machinery that maintains the asymmetric distribution of lipids and proteins to the cell surface. Dependent on their lipid raft affinity newly synthesized apical polypeptides are segregated into distinct vesicle populations subsequent to the passage through the Golgi apparatus. Using a combined fluorescence microscopic and biochemical approach, we found that lipid raft-associated sucrase isomaltase (SI) as well as non-raft-associated lactase-phlorizin hydrolase (LPH) traverse endosomal compartments before entering the apical membrane. Fluorescent fusion proteins of both hydrolases were co-stained with Rab4-, Rab8- and Rab11-positive endosomes in polarized MDCK and non-polarized COS-1 cells. Immunoprecipitation of *post* Golgi vesicles subsequent to different times of TGN- release revealed that LPH and SI navigate in chronological order through Rab4-, Rab8- and Rab11-positive endosomes. Thereafter, the two hydrolases are segregated into distinct vesicle populations. In addition, apical membrane traffic could be significantly blocked by RNAi-mediated depletion of Rab8. These results suggest that lipid raft dependent and independent pathways of apical cargo in polarized cells partition in an endosomal compartment.

Introduction

The plasma membrane of epithelial cells is characterized by the presence of two distinct domains. The apical domain faces the outer lumen and is separated from the basolateral membrane by a tight junction complex (for review see (1)). The integrity of this polarized organization is maintained by a variety of intracellular transport routes combined with machinery that specifically sorts lipids and proteins into well defined carriers. For the delivery of cargo from TGN to the apical or basolateral cell surface direct as well as transcytotic routes have been described (for review see (2)). Recent discoveries suggest that these pathways involve endosomal compartments as key players (3). This is evidenced by the surface delivery of basolateral cargo, which

depends on the presence of the AP-1B clathrin adaptor complex and components of the exocyst in recycling endosomes (4-6).

Endosomal trafficking is based on discrete endocytic and exocytic transport steps, that are regulated by a variety of Rab GTPases (reviewed by (7)). Among Rabs, Rab8 and Rab11 are implicated in exocytic transport from the TGN to the cell surface (8-10). According to studies with constantly active mutants of Rab8 or a peptide derived from the hypervariable C-terminal region, a selective inhibition of this GTPase on basolateral transport processes has been proposed (8;11). The GTPase Rab11 on the other hand is distributed across a variety of intracellular *post* Golgi membranes, including the TGN, recycling endosomes, the apical recycling endosome (ARE) of polarized cells and specialized membrane compartments within regulated secretory cells (12-15). When GTPase-binding or GTPase-deficient mutants of Rab11 were employed, no influence on basolateral recycling could be detected as assessed by transferrin receptor studies (16). However, in BHK21 cells exocytic trafficking from the Golgi to the plasma membrane of VSV-G but not influenza hemagglutinin could be inhibited by co-expression of Rab11^{S25N} (10). Moreover, in CHO or BHK cells Rab11 is involved in transferrin recycling from recycling endosomes (17;18) thus suggesting that functions of Rab11 in controlling trafficking events are cell-specific.

A link between the action of Rab proteins and polarized epithelial sorting comes from studies of the basolateral VSV-G protein, which is directed into the apical membrane domain of MDCK cells in the presence of dominant active Rab8 (11). Moreover, the dominant negative mutant (Rab11^{S25N}-gfp) caused the mistargeting of E-cadherin from the basolateral to the apical surface in these cells (19). This suggests that regulatory actions of Rab8 or Rab11 are placed at endosomal compartments with access to apical or basolateral transport routes.

We studied apical sorting of the two intestinal hydrolases lactase-phlorizin hydrolase (LPH) and sucrase-isomaltase (SI). Both enzymes use different platforms for apical transport. In contrast to LPH, SI associates on the passage to the cell surface with sphingolipid/ cholesterol-rich lipid microdomains or *lipid rafts* (20;21). As a consequence, LPH and SI are segregated into two separate vesicle populations that move along different cytoskeletal tracks to the apical plasma membrane, LPH- (LAVs) and SI-containing apical vesicles (SAVs) (22;23). The two populations are composed of specific polypeptides with central roles in the sorting or transport process (24;25).

In the present study we analyzed the endosomal compartments traversed on the passage from the TGN to the apical cell surface for the involvement of Rab4, Rab8 and Rab11. Immunofluorescence analysis of polarized as well as non-polarized cells in combination with immunoblots from apical *post* Golgi carriers revealed a sequential passage of LPH and SI through Rab4-, -8 and -11 containing compartments. In

polarized cells, this passage was significantly inhibited by RNAi-mediated depletion of Rab8.

Results

Expression of LPH-CFP, SI-YFP and Rab4-, Rab8- or Rab11-DsRed in COS-1 cells

Post Golgi trafficking of LPH-CFP and SI-YFP was initially compared with the endosomal marker proteins Rab4-, Rab8- and Rab11-DsRed in non-polarized COS-1 cells. Based on their flattened morphology these cells are optimal for the visualization of vesicular compartments by confocal fluorescence imaging. The cells were triple transfected with LPH-CFP, SI-YFP and Rab4, Rab8 or Rab11 fused to DsRed. 48 h after transfection the transported material was accumulated in the TGN for 4 h by incubation at 20 °C and the *de novo* biosynthesis was prevented by addition of cycloheximide. Then traffic was released from the TGN for a short period of 10 min at 37 °C and cells were fixed immediately for confocal fluorescence analysis as depicted in Fig. 1A-C. LPH and SI could be detected in the Golgi area, in vesicles and at the plasma membrane, while Rab4-, Rab8- and Rab11-DsRed accumulated perinuclear and also in vesicular structures. These structures were frequently co-stained by each of the Rab proteins and LPH and SI, thus suggesting that in non-polarized cells Rab4, -8 and -11 positive endosomes are traversed by the two hydrolases after TGN exit.

To assess a putative functional role of Rab4, -8 or -11 in *post Golgi* trafficking of the two hydrolases, dominant negative Rab4_{S22N}, Rab8_{T22N} or Rab11_{S25N} with GTP-binding defects (10;26;27) were co-transfected. LPH-YFP and SI-YFP positive vesicular structures that had left the Golgi 10 min after TGN-release were counted from five populations of ten co-transfected cells for each Rab protein (Fig. 1 D+E). Obviously, the presence of Rab8_{T22N}-CFP resulted in an increase in LPH- or SI-YFP containing vesicular structures. Quantification revealed that the number of LPH vesicles was about 3.4±0.2-fold increased, while about 2.0±0.15-fold more SI vesicles were counted in the presence of dominant negative Rab8. This rise in the number of *post Golgi* carriers indicates that in COS-1 cells trafficking of LPH and SI from the TGN to the cell surface can be modulated by dominant negative Rab8. On the other hand, co-expression with Rab4_{S22N} or Rab11_{S25N} decreases the number of vesicular structures positive for SI (minus 55% or 39%) or LPH (minus 35% or 39%). In conclusion, although a blockade of the distinct Rab GTPases had divergent effects on the intracellular accumulation of *post Golgi* carriers for LPH and SI, the tendencies for each Rab mutant were similar with the two model proteins. Thus in general changes in each of the three Rabs affect trafficking of LPH and SI in non-polarized COS cells.

LPH and SI traverse Rab-positive endosomes in polarized MDCK cells

We then studied *post Golgi* endosomal trafficking in polarized MDCK cells stably expressing LPH_{myc} (MDCK-LPH_{myc}) (23) or SI-YFP (MDCK-SI-YFP) (22). Rab4-, Rab8- or Rab11-CFP were transfected

transiently into MDCK-LPH_{myc} or MDCK-SI-YFP. Four days post transfection a TGN-release experiment was performed as indicated above and the transported material was studied 5 min after TGN-release by confocal imaging (Fig. 2A). As described before (8;28;29) Rab4, Rab8 and Rab11 showed a diffuse staining and an accumulation on discrete vesicular structures localized in the perinuclear area just beneath the apical membrane. LPH_{myc} and SI-YFP were detected in intracellular vesicular structures in the subapical area and at the apical membrane. In analogy to our observations in non-polarized cells a cohort of the intracellular vesicular structures was co-stained by the endosomal marker proteins Rab4, Rab8 or Rab11. These structures were mainly located next to the Golgi area in the upper third of polarized MDCK cells. Hence, the two apical hydrolases traverse endosomal compartments after TGN-release in non-polarized and polarized cells.

Next, dominant negative Rab4_{S22N}-, Rab8_{T22N}- or Rab11_{S25N}-CFP was transiently transfected into MDCK-LPH_{myc} or MDCK-SI-YFP cells (Fig. 2B). Confocal analysis of cells expressing the dominant negative Rab isotopes revealed slightly reduced amounts of LPH or SI at the apical membrane. Moreover, large quantities of intracellular vesicles positive for Rab8_{T22N} and LPH or SI were observed. In cells transfected with Rab4_{S22N} or Rab11_{S25N} no significant abnormalities in the intracellular patterns could be detected.

Trafficking delay of LPH and SI following Rab protein depletion in MDCK cells

In a separate approach, intracellular levels of Rab4, -8 or -11 were knocked down by RNA interference. The polarized delivery of LPH or SI was assessed by surface precipitation of biosynthetically labeled MDCK cells (Fig. 3A and C). In these experiments Rab protein levels were reduced to less than 20% according to the corresponding Western-blot analysis (Figures 3B and E). Quantification of the enzymes on the apical or the basolateral surface versus lysate revealed a significant reduction of LPH and SI at the apical membrane in Rab8-depleted cells (Fig. 3 D and F). However, only slight, less significant trafficking delays of LPH and SI could be detected after knockdown of Rab4 or Rab11. The fact that significant effects on the transport kinetics of both apical hydrolases in polarized cells were detected by depletion of Rab8 corresponds to the considerable accumulation of LPH and SI in non-polarized cells expressing dominant negative Rab8. At the same time the role of Rab4 and Rab11 in intracellular trafficking of the two hydrolases seems to be less crucial in polarized cells. Reducing the activities of these two Rab proteins resulted in an increase in cellular transport in non-polarized cells (Fig. 1 D,E) versus a slight decrease in polarized MDCK cells, which can be explained by their changing relevance during cellular polarization.

To exclude the possibility that co-staining of LPH or SI with endosomal structures was due to overexpression of Rab proteins in transiently transfected MDCK cells, we compared intracellular staining of the two hydrolases with endogenous Rab11 by immunohistochemistry 10 min after TGN-release (Fig.

3G). Here, we could show a considerable overlap between vesicular structures positive for endogenous Rab11 and LPH or SI, thus confirming our previous observations.

Immunoblot analysis of LPH and SI carrying post Golgi vesicles

We wondered whether Rab4, -8 or -11 could be detected on *post* Golgi carriers from MDCK cells and employed a biochemical approach. At first, different organelles from MDCK cells were separated by density gradient centrifugation after a period of 10 min release of accumulated material from the TGN. Twelve fractions were collected and separated by SDS-PAGE followed by immunoblot with different compartment specific antibodies. As depicted in Fig. 4 the two hydrolases LPH and SI were mainly present in fraction 5 and in the lighter fractions 8 and 9. Fraction 5 contains large amounts of material from the endoplasmic reticulum as verified by immunoblot with antibodies directed against protein disulfide isomerase (PDI). GM130 of the *cis* Golgi (30) was found in fraction 8, while p230, a marker of the TGN (31), could be identified in fractions 8 to 10. The endosomal proteins Rab4, -8 and -11 accumulated in the same fractions. On the other hand early endosomal antigen 1 (EEA1, (32)) and Rab7, which is involved in endosome to lysosome traffic (33), are spread over fractions 8 to 12. As a conclusion, Golgi derived material as well as endosomes are concentrated in fractions 8 to 10. Interestingly, a small proportion of Rab4, Rab8 and Rab11 was also detected in fraction 5, which harbored material from the ER and Golgi apparatus. This fraction also contained minute quantities of LPH and SI, whereas the predominant pool of the two hydrolases was enriched in fractions 8 and 9.

In the next step, LPH- (LAVs) and SI-carrying apical vesicles (SAVs) were immunoisolated from these fractions and analyzed for the presence of Rab4, -8 or -11 by immunoblot. Fig. 5A indicates that all three Rab proteins are present on the two vesicle populations. Material isolated from MDCK cells not expressing LPH_{myc} or SI-YFP was used as negative control.

To determine the chronology of Rab-association with LAVs or SAVs, the two vesicle populations were immunoisolated after varying time intervals of TGN-release from 0 to 45 min (Fig. 5B). Rab4 could be detected in both carrier populations at the earliest point in time and stays associated up to 5 min after TGN exit. In a period from 2.5 to 7.5 min following TGN-release Rab8 was present in the two populations followed by Rab11 detected in an interval from 5 to 10 min. As a consequence, the peculiar parallels in the binding patterns of LAVs and SAVs indicate that up to 10 min after TGN-release LPH and SI pass through similar endosomal compartments. A clear distinction in the trafficking routes could be detected 20 min after TGN-release, when annexin-2 associates exclusively with SAVs. Immunoblotting revealed that neither TGN p230 nor EEA1, Rab7 or lamp1 were present on the immunoisolated vesicles following TGN-release, which demonstrates that this material is not of *trans* Golgi or early/late endosomal origin.

These biochemical findings were supported by immunohistochemistry with antibodies directed

against p230, EEA1, Rab7 and lamp1. As shown in Fig. 6 no co-staining of LPH or SI with markers of the TGN, early or late endosomes could be detected in MDCK cells 10 min after TGN-release. These findings could also be confirmed for non-polarized COS-1 cells (Fig. S1). Thus supporting the idea that after release of the TGN exocytic trafficking of LPH and SI exclusively comprises the successive passage through endocytic compartments positive for Rab4, -8 and -11.

Discussion

In eucaryotic cells, intracellular transport compartments are characterized by a large number of proteins that allow the budding and segregation of nascent cargo vesicles from the donor membrane and their latter targeting and fusion with an acceptor compartment. Polypeptides from the apical membrane domain of epithelial cells classically reach their destination by a sequential passage from the ER through the Golgi to the TGN, from where they are sorted into apical transport vesicles (34). This final part of the journey could encompass direct traveling to the apical membrane or transit through endosomal compartments. Our data suggest that LPH as well as lipid raft-associated SI are forwarded through endosomes positive for Rab4, -8 and -11 in non-polarized COS-1 and in polarized MDCK cells.

A large amount of knowledge about endosomes in epithelial trafficking comes from studies on the transport of membrane-bound ligands from the basolateral plasma membrane to the apical membrane. In MDCK cells this route encompasses at least three compartments. Internalized receptors from the basolateral membrane first reach EEs, which contain limited amounts of Rab4. This small G protein is predominantly located on the subsequent compartment, the common endosomes (CEs) which are characterized by an acidic pH (pH=5.8) (29). In Caco-2 cells CEs can perform polarized sorting for apical and basolateral material (35). In MDCK cells sorting in the CE can be modulated since overexpression of Rab4 increases transport of transferrin receptor to the apical cell surface (29). The downstream ARE is accessible only for proteins destined for the apical cell surface. Rab11 is found in these transferrin-depleted endosomes (13;28), which are characterized by a nearly-neutral pH (36). Now, the question arises, whether the CE and the ARE, both involved in basolateral to apical transcytosis, are also traversed on exocytic routes?

Evidence for an endosomal passage of secretory cargo comes from yeast cells, where at least one branch of the exocytic pathway transits through endosomes before reaching the cell surface (37). In developing *Drosophila* photoreceptors, rhodopsin is targeted in a Rab11-dependent fashion to the rhabdomere, a specialized domain within the apical membrane (38). The growth factor EGL-17 from *Caenorhabditis elegans* traverses ce-Rab-8 positive endosomes before it reaches the plasma membrane of vulval precursor cells (39). RNAi-mediated depletion of ce-Rab8 in *C. elegans* developing vulva resulted in an intracellular accumulation of the growth factor. In higher eucaryotic adenocarcinoma cells polarized trafficking of the matrix metalloproteinase

MT-MMP is directed through Rab8-positive endosomes previous to entrance into invasive structures at the plasma membrane (40). Moreover, in epithelial cells, the basolateral asialoglycoprotein receptor H1 (41), AP-1B-dependent VSV-G (3) as well as E-cadherin (19) are carried from the TGN to recycling endosomes before they reach the basolateral membrane. This also includes specific protein sorting. Therefore it is very likely that after passage of the Golgi exocytic apical and basolateral cargo is sorted in the TGN and thereafter once more in endosomal compartments before it reaches its final destination.

Our data on endosomal trafficking of raft-associated and non-raft-associated proteins support this scenario and suggest that distinct endosomal compartments are traversed *en route* from the TGN to the apical membrane. In conjunction with endosome exit apical glycoproteins are sorted into distinct vesicle populations based on their *lipid raft* affinity.

Materials and methods

Materials and Reagents

Streptomycin, penicillin, glutamine, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), methionine-free MEM (denoted Met-free medium) and trypsin were purchased from PAA (Pasching, Austria). Fetal calf serum (FCS) was purchased from BioWest (Essen, Germany). Pepstatin, leupeptin, aprotinin, trypsin-inhibitor and molecular mass standards for SDS-PAGE and protein A-sepharose were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany). L-[³⁵S]methionine (>1000 Ci/mmol) was obtained from Hartman Analytic (Braunschweig, Germany). Acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide and N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) were purchased from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Sodium dodecyl sulfate (SDS), ammonium persulfate and dithiothreitol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Restriction enzymes and Taq-polymerase were obtained from MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Germany).

Construction of cDNA Clones

The cDNA of Rab8 (8) was amplified using the primer pair
 5'-GCGAATTCTGCGAAGACCTACGATTACCTG-3'/5'-AAGGATCCTCAGTCACAGAAGAACA
 CATCGG-3' and ligated into the unique sites *EcoRI*/*Bam*HI of the pECFP-C1 vector or pDsred-Monomer-C1 (Clontech). For the generation of pRab11-CFP the cDNA sequence of GFP was substituted by CFP or Dsred in the vector pRab11-GFP (10). The cDNA of canine Rab4 was amplified from a MDCK cDNA library with the primer pair 5'-GCGAATTCCATGGCCGAGACC
 TAC-3'/5'-AGGATCCTCAGCAGCCACAGGG-3' and ligated into the unique sites *EcoRI*/*Bam*HI of the pECFP-C1 vector and pDsred-Monomer-C1 (Clontech). Rab4^{S22N}-pcDNA3 (29) was amplified using the same primer pair and ligated also into the unique sites *EcoRI*/*Bam*HI of the pECFP-C1 vector. The resulting plasmids denoted Rab8_{WT}-CFP/-Dsred, Rab8_{T22N}-CFP, Rab4_{WT}-CFP/-Dsred, Rab4_{S22N}-CFP,

Rab11_{WT}-CFP/-Dsred and Rab11_{S25N}-CFP were confirmed by sequencing.

Cell culture, biosynthetic labeling of cells and immunoprecipitation

COS-1 and MDCK cells were cultured at 37 °C under 5% CO₂ in DMEM low glucose medium or in MEM (PAA), respectively, containing 10% FCS (Biowest). COS-1 cells were transfected by the DEAE-dextran method as described by Naim *et al.* (42). Plasmid and siRNA transfection of MDCK cells was performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

For [³⁵S]methionine labeling, MDCK-LPH cells stably expressing LPH (43) and MDCK-SI (23) cells were grown on transwell filters. Biosynthetic labeling and immunoprecipitation with mAb anti-SI or mAb anti-LPH were performed essentially as described before (23). For surface precipitation biosynthetically labeled cells were incubated for 2 h at 4 °C in the presence of antibody followed by cell lysis and precipitation of the antigen-antibody complex with protein A-sepharose by centrifugation. The precipitated material from the cell surface was washed, while endogenous LPH or SI were immunoprecipitated from the remaining cell lysates. The immunoprecipitates were subjected to 6% SDS-PAGE and phosphoimages were analyzed with the Quantity One software (BioRad). The percentage of SI or LPH protein reaching the cell surface relative to the total amount of protein was calculated.

Vesicle preparation and precipitation

Post TGN vesicles of MDCK-SI-YFP and MDCK-LPH_{myc} cells were isolated as described previously (23). For the enrichment of post TGN vesicles the cells were incubated in the presence of cycloheximide (100 µg/ml) for 4 h at 20 °C to accumulate newly synthesized material in the TGN, followed by TGN-release at 37 °C for definite times. The cell homogenates in HB-T buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM triethanolamine, pH 7.4) were centrifuged on a step sucrose gradient. Fractions were collected from the bottom of each gradient and TGN-38 positive fractions were used for immunoprecipitation with monoclonal (mAb) anti-GFP antibodies (Clontech) or mAb anti-myc (Invitrogen). The samples were washed six times with HB-T buffer prior to SDS-PAGE analysis.

Immunofluorescence

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 20 min. Cells were then permeabilized with 0,1% Triton X-100 in PBS for 20 min, washed with PBS and treated with 5% goat serum in PBS at room temperature for 30 min. Fixed cells were incubated with primary antibody diluted in blocking buffer (goat serum) at room temperature for 1 h. Cells were then washed with PBS three times and incubated with Alexa-conjugated secondary antibodies. Following incubation cells were washed with PBS and mounted with Mowiol.

Confocal fluorescence microscopy

Confocal images of living cells were acquired on a Leica TCS SP2 AOBS microscope using a 40x oil

planapochromat lens (Leica Microsystems) essentially as described before (22). For immunostaining the secondary antibodies anti-mouse Alexa 488, 546, 633 and anti-rabbit Alexa 633/546 were purchased from Molecular Probes (Oregon, USA).

Immunochemical Reagents and Immunoblotting

Immunoblotting employed nitrocellulose membranes (Bioscience, Germany) and HRP-conjugated secondary antibodies which were visualized by ECL (Signal Plus, Pierce). For immunostaining of human SI or myc-tagged LPH, the mouse mAbs of hybridoma HBB 3/705 (44) or mAb anti-myc (Invitrogen) were used. The mAb LAMP1 was also generously provided by H.-P. Hauri (Biozentrum Basel, Switzerland). MAbs directed against Rab4, -8, -11, p230, PDI, GM130 and EEA1 were purchased from BD Transduction Laboratories and β -catenin was purchased from Sigma. Annexin-2 was detected with the mouse monoclonal antibody H28 provided by V. Gerke (Münster, Germany) (45). Polyclonal antibodies (PAb) against Rab7 and Rab11 (Chen et al., 1998) were generously provided by Angela Wandinger-Ness (University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, New Mexico).

RNA interference

For RNA-mediated interference (RNAi) experiments, specific depletion of Rab4, -8 and -11 were performed with the following duplexes: Rab4: 5'-AUCAUGUCUCCUUAUCAGUU-3' / 5'-CUGAUGAAGGAGACAUGAUU-3' and 5'-UGAGCUAAUGUCCUGGAGUU-3' / 5'-CUCCAGGAACAUUAGCUCAUU-3'; Rab8: 5'-GACCUACGAUUACCUGUUCUU-3' / 5'-GAACAGGUAUUCGUAGGUCUU-3' and 5'-CUCAACUUUCAUCUCCACUTT-3' / 5'-AGUGGAGAUGAAAGUUGAGTT-3'; Rab11: 5'-UGUCAGACAGACGUGAAAAUU-3' / 5'-UUUUCACGUCUGUCUGACAUU-3' and 5'-GCACCUGACCUAUGAGAACUU-3' / 5'-GUUCUCAUAGGUCAGGUGCUU-3'. As a control luciferase siRNA was used 5'-CGUACGCGAAUACUUCGATT-3' / 5'-UCGAAGUAUCCGCGUACGTT-3'.

Acknowledgements

Antibodies against LPH, SI and lamp1 were generous gifts from Dr. H.P. Hauri (Biozentrum, University of Basel, Switzerland). The antibodies directed against Rab11 and Rab7 and the Rab11_{WT}-GFP and Rab11_{T25N}-GFP construct were a generous gift from Dr. Angela Wandinger-Ness (University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, New Mexico, USA). The Rab8 constructs were a generous gift from Dr. I. Mellman (Yale University School of Medicine, New Haven, USA). The Rab4_{T22N}-pcDNA3 construct and pAb Rab4 were generous gifts from Dr. P. vanderSluis, (University Medical Center Utrecht, The Netherlands). This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn, Germany (grants JA 1033, Graduiertenkolleg 1216 and Sonderforschungsbereich 593).

Reference List

- (1) Mostov K, Su T, ter Beest M. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* 2003; 5(4):287-293.
- (2) Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Musch A. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(3):233-247.
- (3) Ang AL, Taguchi T, Francis S, Folsch H, Murrells LJ, Pypaert M et al. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* 2004; 167(3):531-543.
- (4) Folsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 1999; 99(2):189-198.
- (5) Gan Y, McGraw TE, Rodriguez-Boulan E. The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* 2002; 4(8):605-609.
- (6) Grindstaff KK, Yeaman C, Anandasabapathy N, Hsu SC, Rodriguez-Boulan E, Scheller RH et al. Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* 1998; 93(5):731-740.
- (7) Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2):107-117.
- (8) Huber LA, Pimplikar S, Parton RG, Virta H, Zerial M, Simons K. Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol* 1993; 123(1):35-45.
- (9) Urbe S, Huber LA, Zerial M, Tooze SA, Parton RG. Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett* 1993; 334(2):175-182.
- (10) Chen W, Feng Y, Chen D, Wandinger-Ness A. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell* 1998; 9(11):3241-3257.
- (11) Ang AL, Folsch H, Koivisto UM, Pypaert M, Mellman I. The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 2003; 163(2):339-350.
- (12) Calhoun BC, Lapierre LA, Chew CS, Goldenring JR. Rab11a redistributes to apical secretory canaliculus during stimulation of gastric parietal cells. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 1):C163-C170.
- (13) Brown PS, Wang E, Aroeti B, Chapin SJ, Mostov KE, Dunn KW. Definition of distinct compartments in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells for membrane-volume sorting, polarized sorting and apical recycling. *Traffic* 2000; 1(2):124-140.
- (14) Leung SM, Ruiz WG, Apodaca G. Sorting of membrane and fluid at the apical pole of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 2000; 11(6):2131-2150.
- (15) Goldenring JR, Smith J, Vaughan HD, Cameron P, Hawkins W, Navarre J. Rab11 is an apically located small GTP-binding protein in epithelial tissues. *Am J Physiol* 1996; 270(3 Pt 1):G515-G525.
- (16) Wang X, Kumar R, Navarre J, Casanova JE, Goldenring JR. Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J Biol Chem* 2000; 275(37):29138-29146.
- (17) Ren M, Xu G, Zeng J, Lemos-Chiarandini C, Adesnik M, Sabatini DD. Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(11):6187-6192.
- (18) Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 1996; 135(4):913-924.

- (19) Lock JG, Stow JL. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 2005; 16(4):1744-1755.
- (20) Danielsen EM. Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes. *Biochemistry* 1995; 34:1596-1605.
- (21) Mirre C, Monlauzeur L, Garcia M, Delgrossi MH, Le Bivic A. Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin. *Am J Physiol* 1996; 271(271):c887-c894.
- (22) Jacob R, Naim HY. Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol* 2001; 11(18):1444-1450.
- (23) Jacob R, Heine M, Alfalah M, Naim HY. Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr Biol* 2003; 13(7):607-612.
- (24) Heine M, Cramm-Behrens CI, Ansari A, Chu HP, Ryazanov AG, Naim HY et al. {alpha}-Kinase 1, a New Component in Apical Protein Transport. *J Biol Chem* 2005; 280(27):25637-25643.
- (25) Jacob R, Heine M, Eikemeyer J, Frerker N, Zimmer KP, Rescher U et al. Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279(5):3680-3684.
- (26) Peranen J, Auvinen P, Virta H, Wepf R, Simons K. Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J Cell Biol* 1996; 135(1):153-167.
- (27) Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nishioka H, Tabuchi A, Kita T. Small GTPase Rab4 regulates Ca²⁺-induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem* 2000; 275(43):33844-33849.
- (28) Casanova JE, Wang X, Kumar R, Bhartur SG, Navarre J, Woodrum JE et al. Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 1999; 10(1):47-61.
- (29) Mohrmann K, Leijendekker R, Gerez L, van der SP. rab4 regulates transport to the apical plasma membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 2002; 277(12):10474-10481.
- (30) Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P et al. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 1995; 131(6 Pt 2):1715-1726.
- (31) Kooy J, Toh BH, Pettitt JM, Erlich R, Gleeson PA. Human autoantibodies as reagents to conserved Golgi components. Characterization of a peripheral, 230-kDa compartment-specific Golgi protein. *J Biol Chem* 1992; 267(28):20255-20263.
- (32) Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL et al. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 1995; 270(22):13503-13511.
- (33) Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 1995; 131(6 Pt 1):1435-1452.
- (34) Griffiths G, Simons K. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 1986; 234:438-443.
- (35) Hughson EJ, Hopkins CR. Endocytic pathways in polarized Caco-2 cells: identification of an endosomal compartment accessible from both apical and basolateral surfaces. *J Cell Biol* 1990; 110(2):337-348.
- (36) Wang E, Brown PS, Aroeti B, Chapin SJ, Mostov KE, Dunn KW. Apical and basolateral endocytic pathways of MDCK cells meet in acidic common endosomes distinct from a nearly-neutral apical recycling endosome. *Traffic* 2000; 1(6):480-493.
- (37) Harsay E, Schekman R. A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol* 2002; 156(2):271-285.

- (38) Satoh AK, O'Tousa JE, Ozaki K, Ready DF. Rab11 mediates post-Golgi trafficking of rhodopsin to the photosensitive apical membrane of *Drosophila* photoreceptors. *Development* 2005; 132(7):1487-1497.
- (39) Kamikura DM, Cooper JA. Clathrin interaction and subcellular localization of Ce-DAB-1, an adaptor for protein secretion in *Caenorhabditis elegans*. *Traffic* 2006; 7(3):324-336.
- (40) Bravo-Cordero JJ, Marrero-Diaz R, Megias D, Genis L, Garcia-Grande A, Garcia MA et al. MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway. *EMBO J* 2007; 26(6):1499-1510.
- (41) Leitinger B, Hille-Rehfeld A, Spiess M. Biosynthetic transport of the asialoglycoprotein receptor H1 to the cell surface occurs via endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(22):10109-10113.
- (42) Naim HY, Lacey SW, Sambrook JF, Gething MJ. Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein. *J Biol Chem* 1991; 266:12313-12320.
- (43) Jacob R, Brewer C, Fransen JA, Naim HY. Transport, function, and sorting of lactase-phlorizin hydrolase in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 1994; 269:2712-2721.
- (44) Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA, Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985; 101:838-851.
- (45) Osborn M, Johnsson N, Wehland J, Weber K. The submembranous location of p11 and its interaction with the p36 substrate of pp60 src kinase in situ. *Exp Cell Res* 1988; 175(1):81-96.

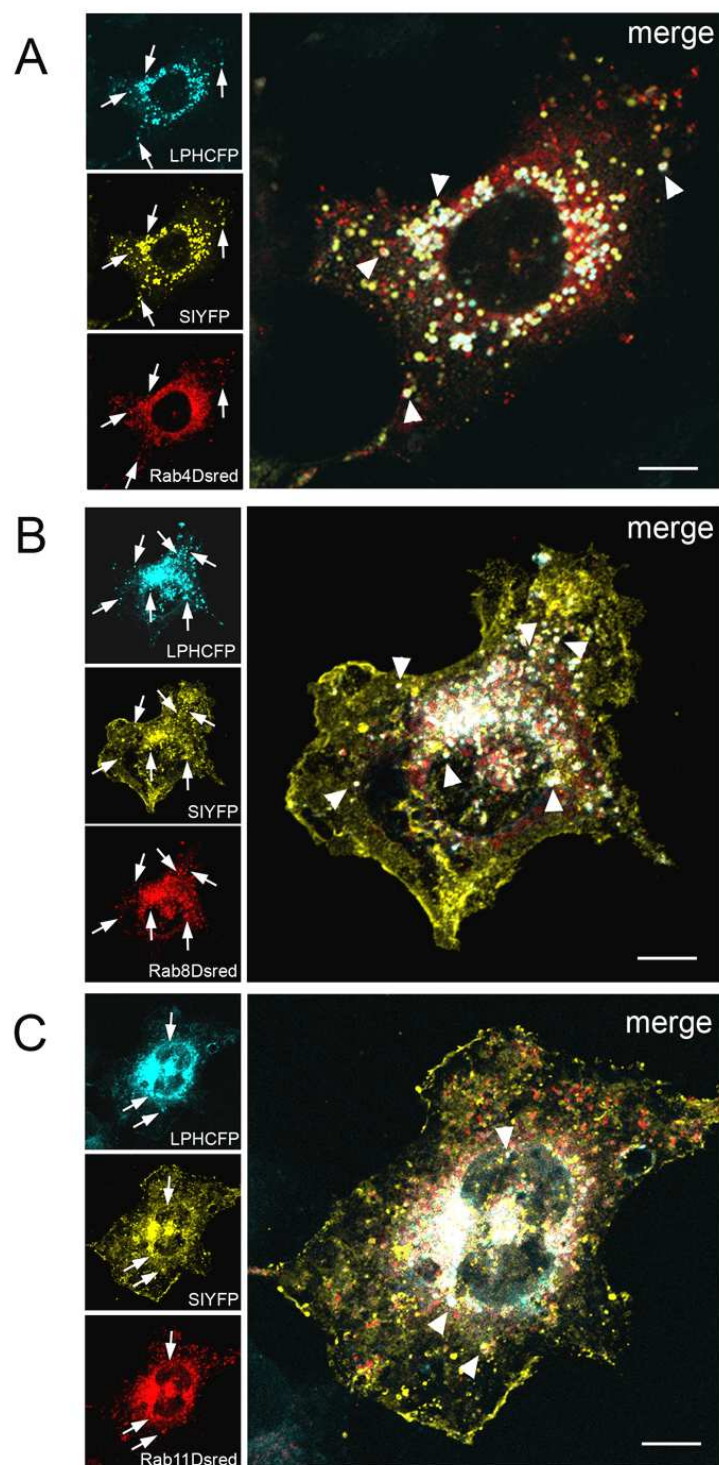


Fig. 1a-c: Confocal analysis of Rab4, -8 and -11 and LPH or SI in transiently transfected COS-1 cells

COS-1 cells were triple-transfected with Rab4_{WT}- (A), Rab8_{WT}- (B) or Rab11_{WT}-Dsred (C) and SI-YFP or LPH-CFP. 48 h after transfection the cells were incubated for 4 h at 20 °C to accumulate proteins in the Golgi apparatus followed by a TGN-release at 37 °C for 10 min. After fixation the cells were analyzed by confocal microscopy. Arrowheads depict Rab-positive endosomes stained by LPH and SI. Scale bars, 10 μm

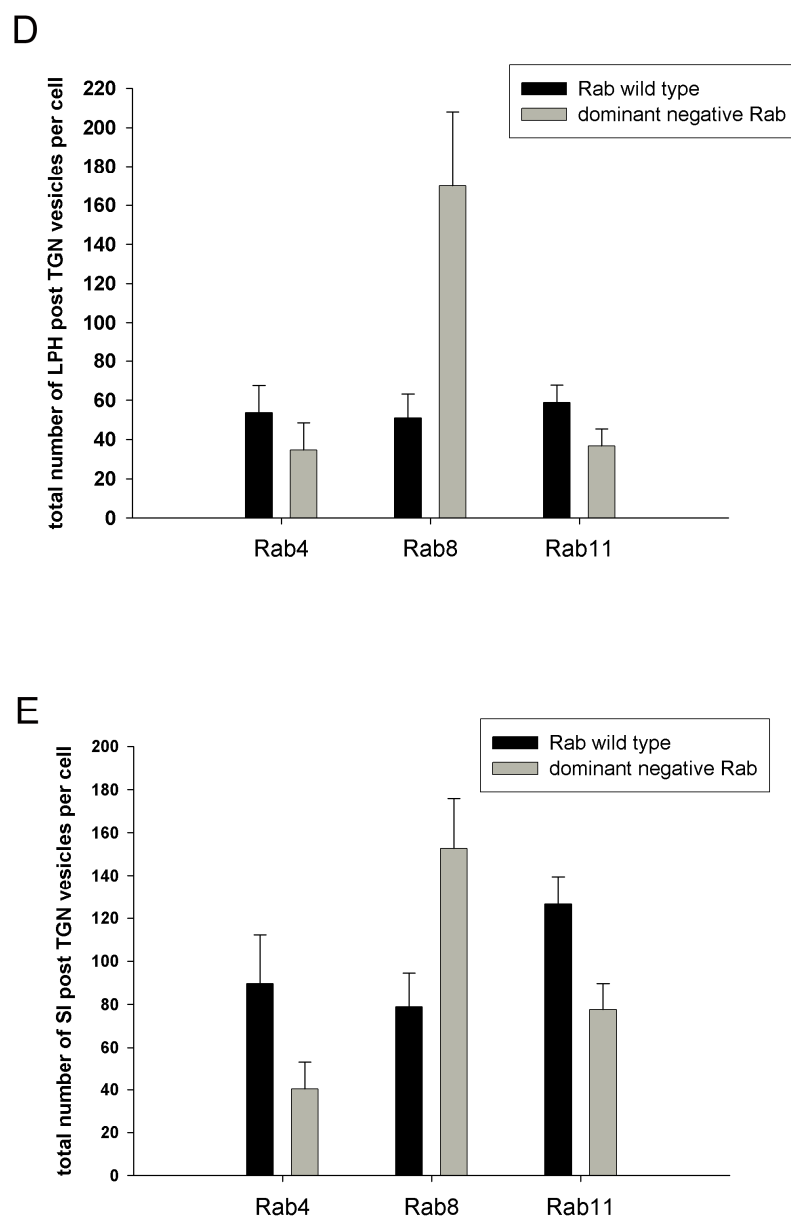


Fig. 1d-e: Confocal analysis of Rab4, -8 and -11 and LPH or SI in transiently transfected COS-1 cells

Cells co-expressing dominant negative Rab mutants or Rab wild type were fixed 10 min after TGN-release and LPH- (D) or SI-positive (E) *post*-TGN carriers were counted from five populations of ten co-transfected cells for each Rab protein for quantification.

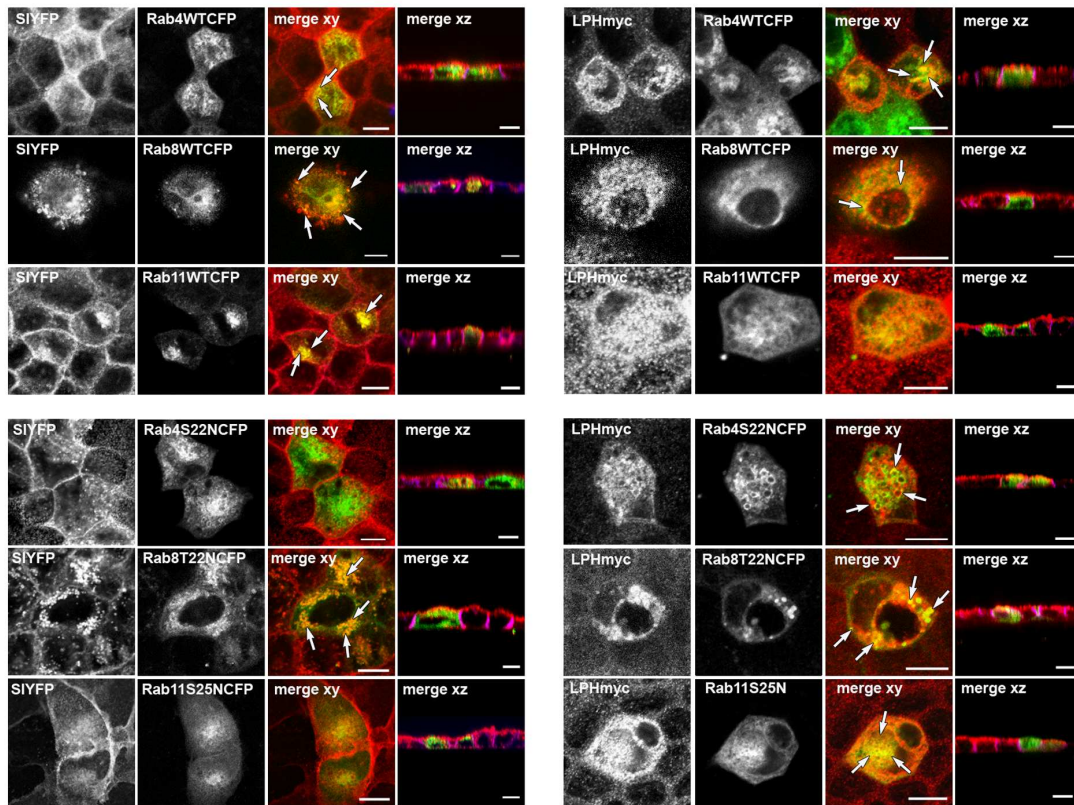


Fig. 2: Confocal analysis of MDCK-LPH_{myc} or MDCK-SIYFP cells transfected with wild type and dominant negative variants of Rab4, -8 or -11-CFP

MDCK-SI-YFP and LPH_{myc} cells were grown on transmembrane filters and transfected 2 h after seeding with Rab4_{WT}⁻, Rab8_{WT}⁻, Rab11_{WT}⁻, Rab4_{S22N}⁻, Rab8_{T22N}⁻ or Rab11_{S25N}⁻-CFP. Five minutes following TGN-release polarized cells were scanned by confocal microscopy just beneath the apical membrane in xy-view or in xz-view. SI and LPH are shown in red, Rab proteins are depicted in green. Arrows indicate vesicular structures stained by LPH or SI and the corresponding Rab protein. Scale bars, 10 μ m

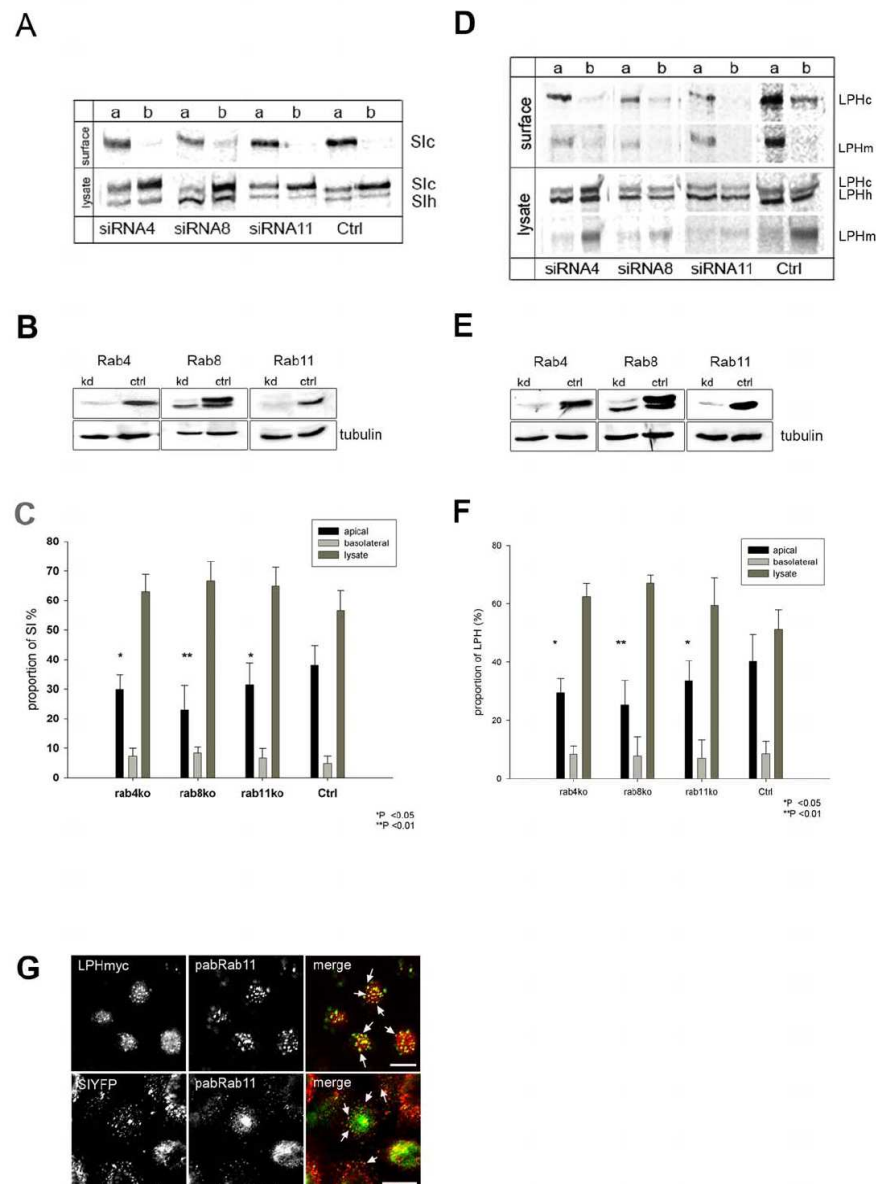


Fig. 3: Impact of siRNA mediated Rab4, -8 or -11 depletion on apical trafficking of LPH or SI

MDCK-LPH (A, B, C) and MDCK-SI (D, E, F) cells were grown on transmembrane filters and biosynthetically labeled with ³⁵S-methionine for 6 h in the presence or absence of Rab-specific RNAi. Cell surface immunoprecipitation of LPH or SI from the apical (a) or basolateral (b) membranes (surface) was performed with the corresponding antibodies and cytosolic LPH or SI was precipitated from the remaining cell lysates for comparison (A, D). The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE followed by phosphorimager analysis. For each experiment 30 μ l of cell lysates from Rab-depleted or control cells were analyzed by western blotting with mAb anti-tubulin or specific anti-Rab antibodies (B, E). High-mannose (LPH_H, SI_H) or complex glycosylated forms (LPH_C, SI_C) are indicated. LPH_m, mature form of LPH. The proportions of SI and LPH from four independent experiments were quantified (C, F). G. MDCK-SI-YFP and MDCK-LPH_{myc} cells were grown on coverslips for 5 days, fixed and stained for immunofluorescence with pAb anti Rab11 / Alexa Fluor 488 (green) and mAb anti myc / Alexa Fluor 633 (red) for LPH. SI (red) was detected by YFP-fluorescence. Scale bars, 10 μ m

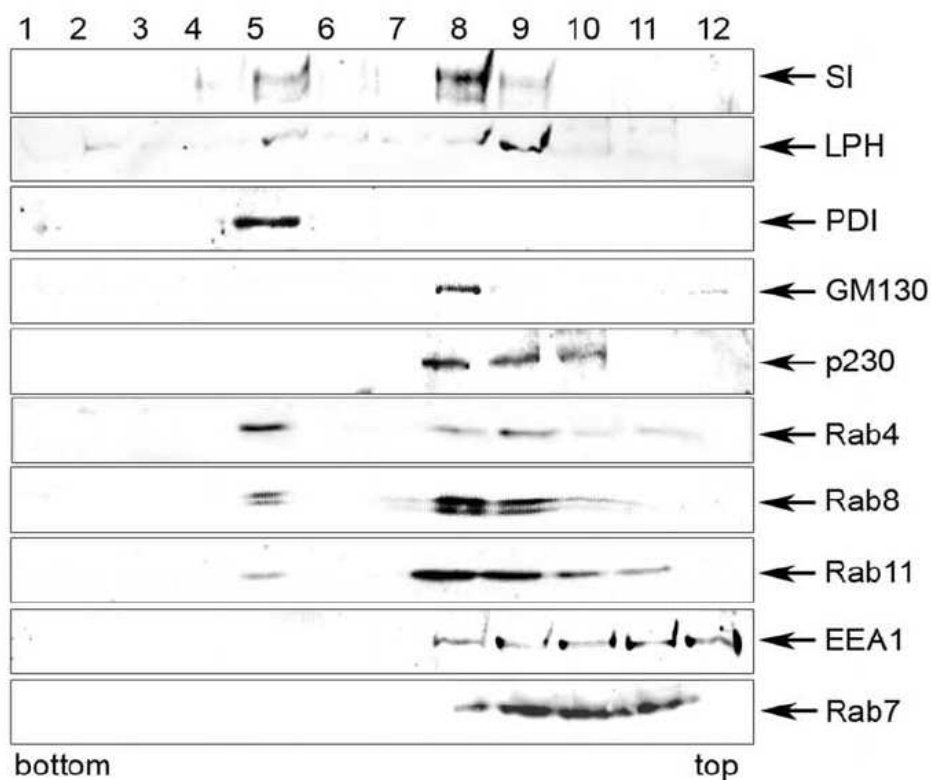


Fig. 4: Fractionation of cellular organelles from MDCK cells after TGN-release

For a TGN accumulation of newly synthesized material MDCK cells were incubated at 20 °C for 4 h followed by a TGN-release at 37 °C for 10 min. Cellular homogenates were separated by density gradient centrifugation. 1 ml fractions were collected from the bottom (2 M) to the top (0,8 M) of a sucrose gradient, loaded on SDS-PAGE and the blotted filter was stained with antibodies directed against SI, LPH, Rab4, -7, -8, -11, PDI, GM130, p230 and EEA1

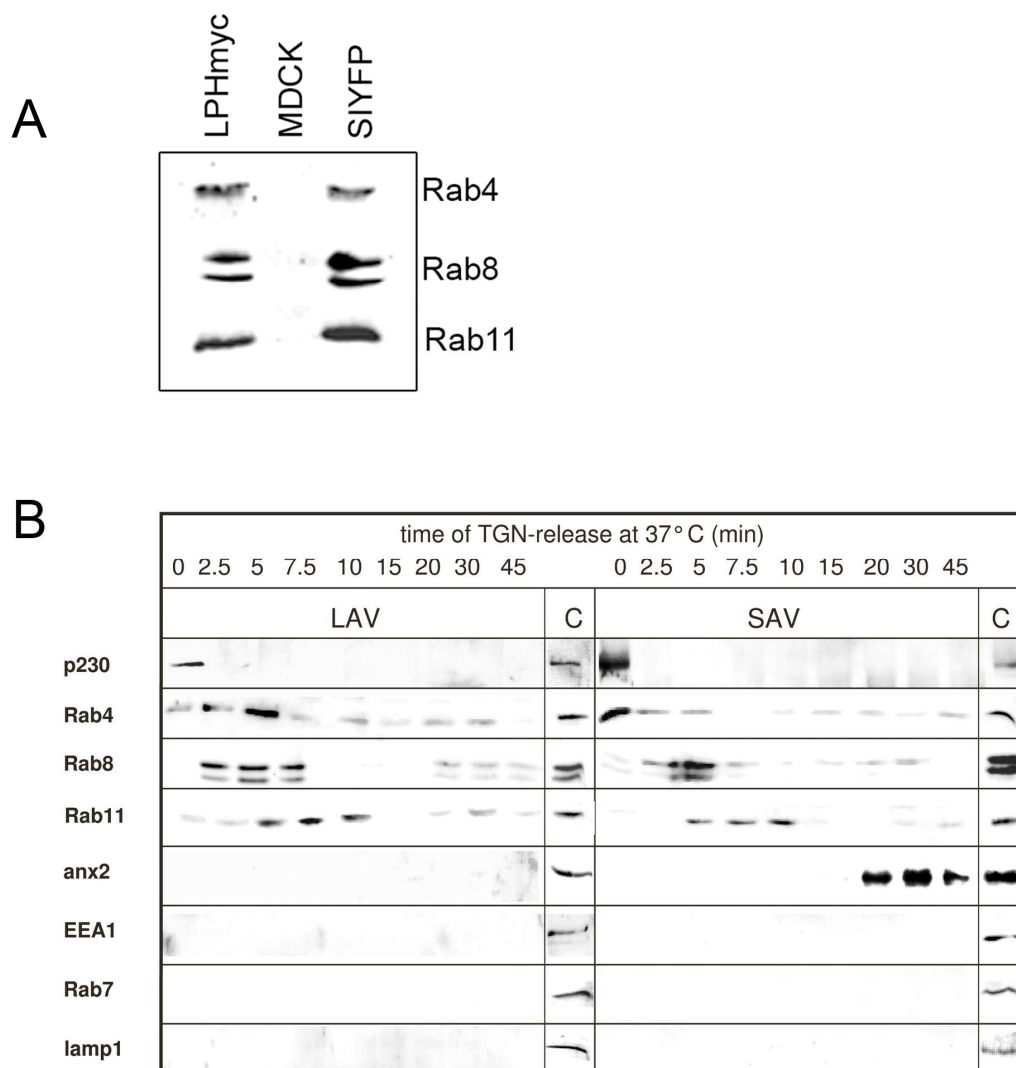


Fig. 5: Identification of Rab-proteins on immunisolated apical vesicles after different times of TGN-release

Newly synthesized material was accumulated in MDCK, MDCK-LPH_{myc} and MDCK-SI-YFP cells followed by a release at 37 °C for 5 min (A) or for distinct time intervals (B). Cell homogenates were loaded onto a step sucrose gradient and *post*-TGN vesicles were immunisolated with mAb anti-myc (LAV) or anti-GFP (SAV). The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and labeled with different antibodies by immunoblot. Immunoblots of cellular lysates are depicted as control (C)

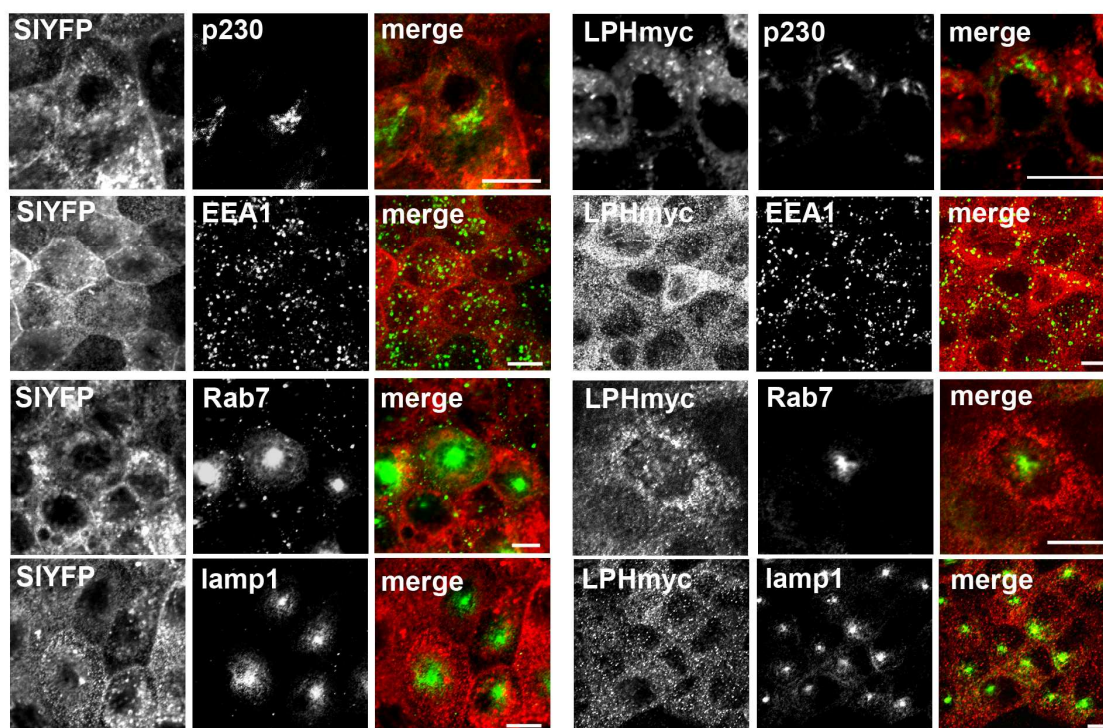
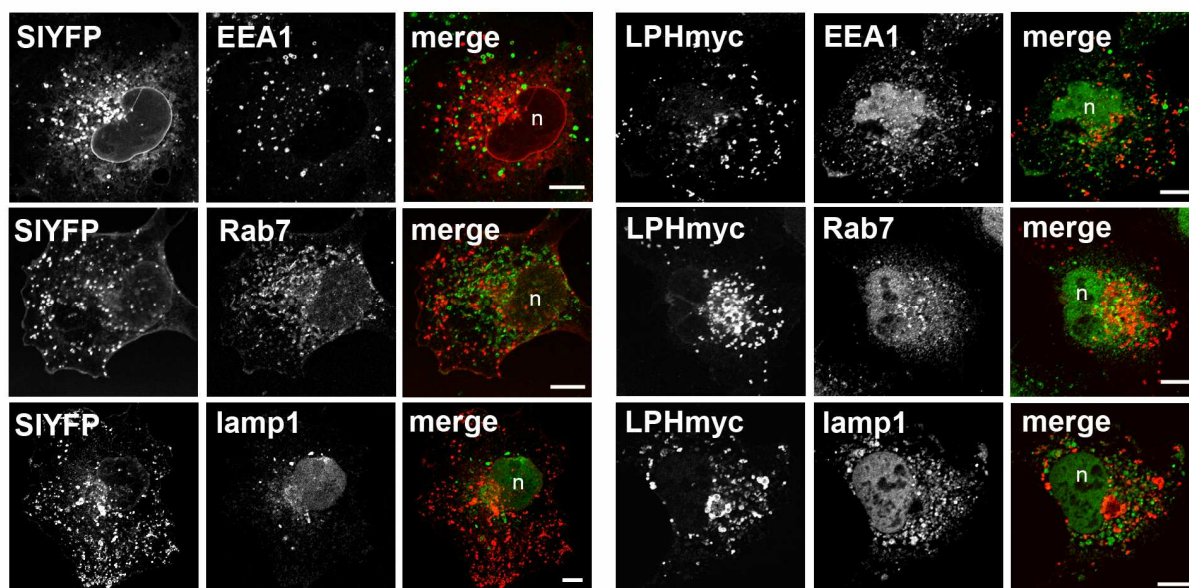


Fig. 6: 10 min following TGN-release neither the TGN nor early or late endosomes are co-stained by LPH or SI in polarized cells

MDCK-LPH_{myc} or MDCK-SI-YFP cells were grown on filters for 5 days. 10 min after TGN-release the cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and stained for immunofluorescence with antibodies against p230, EEA1, Rab7 or lamp1 / Alexa Fluor 488 (green). LPH was labeled with mAb or pAb anti myc / Alexa Fluor 546 (red) and SI (red) was detected by YFP-fluorescence. No co-staining between LPH or SI and the TGN or early / late endosomes could be detected. Scale bars, 10 μ m



Suppl. Fig. S1: 10 min following TGN-release neither the TGN nor early or late endosomes are co-stained by LPH or SI in non-polarized COS-1 cells

COS cells were transfected with SI-YFP or LPHmyc (red). 48 h after transfection the cells were incubated for 4 h at 20 °C to accumulate proteins in the Golgi apparatus followed by a TGN-release at 37 °C for 10 min. The cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and stained for immunofluorescence with antibodies directed against EEA1, Rab7 or lamp1 (green). n, nucleus. Scale bars, 10 μ m

8.4 Methoden

In diesem Abschnitt erfolgt die Beschreibung der Methoden für die Versuche, welche in Abschnitt 3.4 aufgeführt wurden.

8.4.1 Transiente Transfektion von COS-1-Zellen

Säugetierzellen in Zellkultur können durch Aufnahme von Expressionsplasmiden, welche den offenen Leserahmen für ein Protein enthalten, zur Synthese dieses exogenen Proteins veranlasst werden. Die Expression ist zeitlich begrenzt und wird als transiente Transfektion bezeichnet.

Die hier gezeigten Transfektionen von COS-1-Zellen wurden nach der DEAE-Dextran-Methode (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 2001) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der durch das Polykation vermittelten Erhöhung der DNS-Absorption an der Zelloberfläche. Die negativ geladene DNS wird in Gegenwart von hochmolekularen, positiv geladenen Diethylaminoethyl-Dextran-Partikeln in die Zellen aufgenommen.

Die Transfektion wurde bei einer optimalen Konfluenz von 40-60 % durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 6,5 mM Na₂PO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH 7,35) wurden die Zellen mit einer Mischung aus 1,5 ml Transfektionsmedium (DMEM *low glucose*, 1 % Penicillin / Streptomycin, 1 % Glutamin), 5 µg DNS und 9 µl einer DEAE-Dextran-Stammlösung (50 mg / ml) für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und alle 15 min vorsichtig geschwenkt. Nach Absaugen des DEAE-Dextran-DNS-Komplexes wurden die Zellen in 10 ml DMEM-Kulturmedium (DMEM *low glucose*, 1 % Penicillin / Streptomycin, 1 % Glutamin, 10 % FKS) mit 600 µg Chloroquin für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das mit Chloroquin versetzte Medium abgesaugt und die Zellen für 36-48 Stunden in neuem DMEM-Kulturmedium bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

48 Stunden nach der Transfektion konnten die Zellen entweder für die Fluoreszenzmikroskopie oder die biochemischen Versuche verwendet werden.

8.4.2 TGN-Block und TGN-Exit – Vorbereitung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die auf Deckgläschen transfizierten COS-1-Zellen wurden für vier Stunden bei 20 °C und 5 % CO₂ in Anwesenheit von Cyclohexamid (100 µg / ml Medium) inkubiert. Bei einer Temperatur von 20 °C lassen sich neu synthetisierte Proteine im TGN akkumulieren (Naim und Jacob 2001). Das bedeutet, dass keine exozytotischen Proteine das TGN verlassen können, jedoch Proteine vom ER und *cis*-Golgi in das TGN progressieren (TGN-Block). Eine anschließende Inkubation für spezifische Zeitpunkte bei 37 °C und 5 % CO₂ lässt die Vesikel synchronisiert aus dem TGN frei (TGN-Exit).

Die anschließende Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) zu bestimmten Zeitpunkten nach TGN-Exit stoppt diesen Prozess.

Die Inkubation in Anwesenheit von Cyclohexamid verhindert, dass während des TGN-Blocks Proteine neu synthetisiert werden und sich zum Start des TGN-Exits proximal zum TGN befinden. Während des Exits würden sie dann erst in das TGN progressieren und dieses nicht synchronisiert verlassen. Cyclohexamid hemmt die Peptidyltransferase bei Eukaryoten und verhindert dadurch die Proteinbiosynthese an den Ribosomen.

8.4.3 Immunfluoreszenz

Endogene Proteine können nach einer Behandlung mit spezifischen Antikörpern mit Hilfe der Immunfluoreszenz lokalisiert werden. Der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelte sekundäre Antikörper kann durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge und der damit verbundenen Emission das gesuchte Protein als farbiges Signal im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

Die Zellen wurden einmal mit PBS⁺⁺ (PBS+ 1 mM MgCl₂ + 1 mM CaCl₂) gewaschen und für 15 min mit 4 % PFA fixiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS⁺⁺ und die Permeabilisierung der Zellen für 15 min mit 0,1 %

Triton-X100 / PBS⁺⁺. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ folgte eine anschließende Inkubation in 5 % Ziegenserum / PBS⁺⁺ für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach Abblocken schloss sich die Inkubation mit spezifischen primären Antikörpern verdünnt in 5 % Ziegenserum an. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei Raumtemperatur, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen bevor der Fluoreszenz-gekoppelte Zweitantikörper auf die Zellen gegeben wurde. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in 5 % Ziegenserum / PBS verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen in Mowiol eingebettet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.

8.4.4 Auswertung der Kolokalisationsstudien anhand eines Zytofluorogramms

Mit Hilfe eines Zytofluorogramms lässt sich die Häufigkeitsverteilung von Intensitätswerten graphisch aufbereiten (siehe Abb. 8.1). Das Zytofluorogramm wurde bei den Experimenten aus zwei Detektionskanälen erzeugt. Dabei wird jede Achse einem der beiden Detektionskanäle zugeordnet. Dargestellt werden die Intensitäten der jeweiligen Detektionskanäle in einer zweidimensionalen Punktwolke. Je heller ein Pixel im Zytofluorogramm ist, desto häufiger ist der jeweilige Intensitätswert. Der Bereich der Kolokalisation liegt auf der 45°-Achse des Histogramms (siehe Abb. 8.1). Der Bereich wird durch die Region definiert, in der beide Kanäle über dem roten und grünen Schwellwert (*threshold*) liegen.

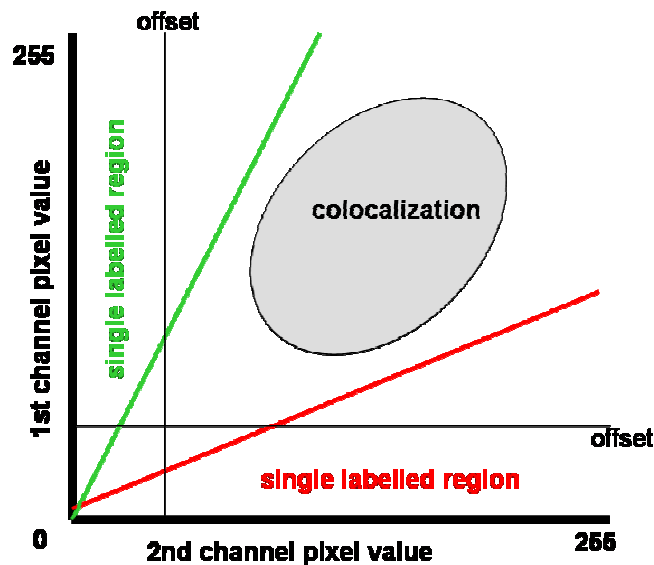


Abb. 8.1: Schematische Darstellung eines Zytofluorogramms

Die X- und Y-Achse zeigen die beiden Detektionskanäle. Die *single labelled region* bezeichnet den Bereich, in dem das zu detektierende Protein keine Kolokalisation mit dem anderen Protein eingeht. Zwischen den beiden Regionen liegt der Bereich der Kolokalisation.

8.4.5 Biosynthetische Markierung und Oberflächenimmunpräzipitation

Bei der Oberflächenimmunpräzipitation ist es das Ziel, Oberflächenproteine der Zelle – sowie zur Quantifizierung die in der Zelle verbliebene Menge dieser Proteine – mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers zu isolieren. Nach erfolgter Lyse wird zur Trennung der Antigen-Antikörper-Komplexe aus dem Zellgemisch Protein-A-Sepharose (PAS) verwendet. Dabei handelt es sich um das Protein A aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus*, das an die Fc-Abschnitte vieler Immunglobulinklassen bindet. Protein A ist hier kovalent an so genannte *beads*, eine Sepharose-4B-Matrix, gekoppelt, welche bei niedrigtouriger Zentrifugation sedimentiert werden kann.

Transfizierte COS-1-Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion und LPHpcDNA3- und SI-MDCK-Zellen fünf Tage nach Aussäen mit L-[³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert (Torian und Kenny, 1986). Dafür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 5 ml defizienten MEM-Medium (Methionin

freies Medium mit 292 µg / ml L-Glutamin, 100 U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das methioninfreie Medium gewechselt und die Zellen mit 50 µCi L-[³⁵S]-Methionin versetzt, welches in die neu synthetisierten Proteine eingebaut wurde.

Es erfolgte für die COS-1-Zellen eine sechs-stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Die MDCK-SI- und LPHpcDNA3-MDCK-Zellen wurden für vier Stunden bei 37 °C und nach einem Mediumwechsel für weitere sechs Stunden bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für bestimmte Zeitintervalle bei 37 °C und 5 % CO₂ erwärmt.

Nach der radioaktiven Markierung wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern, mAb-SI bzw. mAb-LPH, für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Dies ermöglicht eine Bindung des Antikörpers mit dem zu diesem Zeitpunkt an der Oberfläche befindenden Protein. Die anschließende Herstellung von Zelllysaten wurde nach der Methode von Naim durchgeführt (Naim *et al.*, 1988).

Die Zellen wurden sechsmal mit PBS / 0,1 % BSA gewaschen mit je 500 µl Lysispuffer pro 100 mm Platte (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 0,5 % Natriumdeoxycholat und 0,5 % Triton X-100) und 20 µl Proteaseinhibitoren (1 µg / ml Antipain; 5 µg / ml Aprotinin; 5 µg / ml Leupeptin; 1 µg / ml Pepstatin A; 50 µg / ml Trypsin-Inhibitor und 1 mM PMSF) lysiert. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber von den Filtern gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf einem Kippschüttler bei 4 °C lysiert. Nach der Lyse wurden unlösliche Zellbestandteile für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl Protein-A-Sepharose-beads versetzt. Die Ausbildung der Antigen-Antikörper-PAS-Komplexe erfolgte über Nacht auf einem Kippschüttler bei 4 °C.

Durch niedrigtourige Zentrifugation bei 5000 rpm wurden die beads am nächsten Tag pelletiert. Die sedimentierten beads wurden dreimal mit Waschpuffer 1 (0,5 % Triton X-100, 0,005 % Natriumdeoxycholat in PBS) und Waschpuffer 2 (500 mM NaCl, 0,5 % Triton X-100, 10 mM EDTA, 125 mM Tris-HCl, pH 8,0) gewaschen.

Der Überstand wurde erneut mit Antikörpern gegen SI und LPH sowie PAS für drei Stunden bei 4 °C inkubiert, um so das im Zelllysat verbliebene radioaktiv markierte

Protein zu präzipitieren. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die *beads* wie beschrieben gewaschen und die Präzipitate mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt.

8.4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinextrakten entsprechend ihres Molekulargewichts geht auf eine Methode von Laemmli zurück (Laemmli, 1970). Die Proteine werden vor dem Gellauf denaturiert und erhalten durch die Bindung von SDS eine negative Ladung. Je nach gewählten Pufferbedingungen können native oder denaturierende Gele verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich denaturierende, diskontinuierliche Acrylamidgele verwendet.

Es kommen vertikale Gelapparaturen zum Einsatz, die zunächst ein kurzes und niedrigprozentiges, d.h. großporiges, Sammelgel enthalten, in welchem die Proteine konzentriert und zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt werden. Im sich daran anschließenden Trenngel werden diese sodann entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Der prozentuale Anteil an Acrylamid im Trenngel muss dabei auf die Größe des Proteins abgestimmt werden. Für SI und LPH eignet sich ein 6 %-iges Trenngel. Die Zusammensetzung des Sammelgels bleibt hingegen immer gleich.

Gießen des Gels:

Die Gele werden nacheinander in die vorbereitete Kammer gegossen und können nach der Polymerisation in die Laufkammer eingebaut werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von APS und TEMED gestartet.

Gelschema	Sammelgel	Trenngel
H ₂ O	7,8 ml	8,25 ml
Tris-HCl 1 M; pH 6,8	1,45 ml	-
Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8	-	3,85 ml
30 %-ige Acrylamid-Lösung	1,95 ml	3,1 ml
20 %-ige SDS-Lösung	57,5 µl	77,5 µl
TEMED	11,5 µl	11,5 µl
10 %-ige APS-Lösung	115 µl	155 µl

Die Proben wurden für die Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen in 30 µl Lämmli-Puffer (6 % SDS, 30 % Glycerin, 150 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,02 % Bromphenolblau) in Anwesenheit von 150 mM DTT aufgenommen und 10 min bei 95 °C erhitzt.

Nach erfolgtem Gellauf wurden die Gele für 45 min in einer Lösung aus 10 % Essigsäure und 25 % Isopropanol fixiert und anschließend getrocknet.

Probenanalyse

Zur Dokumentation wurden die getrockneten Gele für 1-2 Tage auf einem *Screen* exponiert und mit dem *Phospho-Imager-FLA-3000* ausgewertet.

8.5 Lebenslauf

Name: Catharina Irene Anna Henny Cramm-Behrens
Geburtsdatum: 06.02.1978
Geburtsort: Salzgitter-Bad
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung:

08 / 1984 – 07 / 1988 Grundschule Gehrden
08 / 1988 – 07 / 1990 Orientierungsstufe Gehrden
08 / 1990 – 06 / 1997 Matthias Claudius Gymnasium Gehrden

Hochschulausbildung:

WS 1997 – SS 2003 Studium der Biologie an der Universität Hannover
1999 Vordiplom
2002 Diplomprüfung (Genetik, Zellbiologie, Virologie)
2003 Diplomarbeit (Charakterisierung des MAL-Proteolipids im apikalen Proteintransport) am Institut für Physiologische Chemie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

02 / 2004 – 03 / 2008 Anfertigung der Doktorarbeit im Institut für Zytobiologie- und Zytopathologie an der Philipps-Universität Marburg

Veröffentlichungen: Alpha-Kinase 1, a New Component in Apical Protein Transport (Journal of Biological Chemistry 2005)

Requirement for Galectin-3 in Apical Protein Sorting (Current Biology 2006)

Endosomes sort Apical Cargo into Distinct Transport Carriers (Traffic, submitted)

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel "Charakterisierung der apikalen Transportwege und beteiligten Proteinkomponenten in polaren Epithelzellen" selbstständig ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Datum

Catharina Cramm-Behrens

8.7 Erklärung über den eigenen Anteil an den wissenschaftlichen Publikationen

Publikation 1:

Publikation 1: Martin Heine, Catharina I. Cramm-Behrens, Athar Ansari, Hsueh-Ping Chu, Alexey Ryazanov, Hassan Y. Naim und Ralf Jacob; α -Kinase 1, A New Component in Apical Protein Transport, *J. Biol. Chem.*, 2005 Jul 8; 280 (27): 25637-43

Eigenanteil: Eigenständige Klonierung der ALPK-1 Konstrukte, Durchführung von Transfektionen und konfokalmikroskopische Aufnahmen, Mithilfe bei Vesikelisolationen

Publikation 2:

Delphine Delacour, Catharina I. Cramm-Behrens, Hervé Drobecq, Andre Le Bivic, Hassan Y. Naim und Ralf Jacob; Requirement for Galectin-3 in Apical Transport, *Curr. Biol.*, 2006 Feb 21; 16 (4): 408-414

Eigenanteil: Klonierung der Rab-11 und LPH-YFP Konstrukte, Vesikelisolation und Durchführung des TGN-Exit Experiments, Erstellung einer stabilen MDCK-LPH_{myc}-Zelllinie

Publikation 3:

Catharina Cramm-Behrens, Martina Dienst, Ralf Jacob; Endosomes Sort Apical Cargo into Distinct Transport Carriers; *Traffic*, submitted

Eigenanteil: Durchführung und Auswertung aller dargestellten Untersuchungen.

unveröffentlichte Daten:

Durchführung und Auswertung aller Experimente der in diesem Teil aufgeführten Ergebnisse. Erstellung einer stabilen LPHpcDNA3-MDCK-Zelllinie.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Ralf Jacob für die Überlassung des interessanten Themas und für die Betreuung während der Doktorarbeit. Mein Dank gilt auch seiner Diskussionsbereitschaft und dem sehr guten Arbeitsklima.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Uwe Maier für die freundliche Übernahme der Betreuung der Arbeit als Doktorvater.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Martina Dienst, Waltraud Ackerman und Ksenia Astanina, die mir mit Rat, Tat und Humor das Leben im Labor vereinfacht haben. Sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die durch sie geschaffen wurde und für jedes aufmunternde Wort und Gespräch sei es fachlicher oder nicht-fachlicher Art.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei meinem ehemaligen Kollegen Martin Heine, durch dessen Ratschläge und Diskussionsbereitschaft die Laborarbeit erleichtert wurde und für all die Gespräche auch nicht fachlicher Themen. Ein ganz großes Dankeschön gilt ihm bezüglich der Korrektur dieser Arbeit.

Mein Dank gilt Maurizio di Stasio für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die moralische Unterstützung in der Zeit, in der die Arbeit zusammengestellt wurde.

Der Platz an dieser Stelle erlaubt es nicht, all den lieben Menschen und Freunden persönlich zu danken, die mich während meines Werdegangs begleitet haben. Die immer eine Schulter oder ein Lächeln für mich hatten und die mich aufgebaut haben, wenn der Laborfrust zu groß wurde. Ein schlichtes Dankeschön an dieser Stelle dafür, dass sie mir in jeder Lebenssituation zur Seite gestanden haben!

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere Irene und Christine Cramm-Behrens, Maria Mensch und Thaddäus Delebinski, die mich über die Jahre begleitet haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließen möchte ich mit einem Zitat von Vincent van Gogh:

Das Gelingen ist manchmal das Endresultat einer ganzen Reihe missglückter Versuche.